

**„Die molekulare Evolution der  
Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoden“**

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

**Kristina Kusche**

geb. in Waiblingen

Mainz, November 2001

Tag der mündlichen Prüfung : 21.Dezember 2001

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Markl herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine Unterstützung und die hervorragende Betreuung bedanken.

Bei meinem Betreuer P.D. Dr. Thorsten Burmester möchte ich mich ganz besonders herzlich für das wunderschöne und ergiebige Thema, die freundschaftliche Zusammenarbeit, Unterstützung und (meistens) große Geduld bedanken.

Frau Heide Storz und Herrn Dr. Wolfgang Gebauer danke ich aufrichtig für die nette Hilfe in allen biochemischen und rechnerischen Angelegenheiten.

Dr. Uli Meißner, Michi Stohr und Dr. Frank Depoix gilt mein großer Dank, da sie sich bei allen Fragen zu dem „Problem“ Computer rührend um mich gekümmert haben. Und auch vielen Dank für schöne und bunte Bilder.

Für EM-Aufnahmen geht mein Dank an Dr. J.R. Harris und Dr. W. Gebauer.

Den Diplomandinnen Conny Milke und Anne(mie) He(i)mbach möchte ich ganz besonders für ihre hervorragende Arbeit während ihres F2-Praktikums und für die nette Zeit mit ihnen im Labor danken.

Ansonsten gibt es noch ein ganz großes DANKE für das schöne Arbeitsklima und viel Spaß an die gesamte Arbeitsgruppe.

Und selbstverständlich gilt meine allergrößte Dankbarkeit meiner Familie und Timmi, die immer an mich geglaubt haben und mir in Krisenzeiten zur Seite standen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1. Respiratorische Proteine .....	1
2. Die Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden .....	2
3. Allgemeiner Aufbau des Arthropoden Hämocyanins .....	4
3.1 Das Hämocyanin der Crustacea.....	7
3.2. Das Hämocyanin der Myriapoda .....	9
3.3. Hämocyanin bei Onychophora ? .....	10
4. Biosyntheseorte des Hämocyanins .....	11
5. Funktion des Hämocyanins .....	11
6. Hämocyanine und Evolution.....	12
7. Ziel dieser Arbeit .....	13
<b>B. Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
1. Tiere .....	14
1.1 Crustacea.....	14
1.2 Myriapoda.....	15
1.3 Onychophora.....	16
1.4 Hälterung .....	17
1.5 Tierschutzaspekte.....	17
2. Verwendete Chemikalien und Geräte .....	17
3. Allgemeine proteinbiochemische Methoden .....	18
3.1 Entnahme der Hämolymphe .....	18
3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	18
3.2.1 Extinktionsmessung.....	18
3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	19
3.3 Dialyse.....	19
3.4 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	20
3.5 Coomassie-Färbung.....	22
4. Blottingmethoden.....	23
4.1 „Semidry“ Westernblot .....	23
4.1.1 PonceauS-Färbung .....	23
4.2 Southernblot .....	24
4.3 Northern Blot (Alwin <i>et al.</i> , 1977).....	25
5. Sauerstoffbindungskinetik .....	26
6. Elektronenmikroskopie .....	26

---

7. Test auf Phenoloxidaseaktivität.....	27
8. Mikrobiologische Methoden.....	27
8.1 Bakterienstämme und Vektoren .....	27
8.2 Nährmedien und Agarplatten .....	28
8.3 Glycerinkulturen .....	29
8.4 Plattenkulturen .....	29
8.5 Flüssigkulturen .....	29
8.6 Herstellung kompetenter Bakterien .....	30
8.7 Transformation kompetenter Bakterien .....	30
9. Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	31
9.1 Präzipitation von Nukleinsäuren .....	31
9.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	31
9.3 Präparation von Plasmid-DNA.....	32
9.4 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen.....	32
9.5 Sondenherstellung .....	33
9.5.1 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden.....	33
9.5.2 <i>in vitro</i> Transkription.....	34
9.6 Gelelektrophorese.....	35
9.6.1 DNA-Gelelektrophorese.....	35
9.6.2 RNA-Gelelektrophorese.....	36
9.7 DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	37
10. Präparation von Gesamt-RNA.....	37
10.1 RNeasy Maxiprep Kit der Firma Qiagen GmbH (Hilden) .....	38
10.2 RNA-Präparation nach GTC-Methode.....	38
10.3 Präparation von poly-A <sup>+</sup> -RNA mit PolyAtract mRNA Isolation System I (large scale) und IV (small scale) der Firma Promega (Mannheim).....	39
11. Synthese von cDNA-Banken .....	40
11.1 Erststrangsynthese .....	40
11.2 Zweitstrangsynthese.....	41
11.3 Größenfraktionierung .....	41
11.4 Ligation in die Vektorarme und Verpackung .....	41
11.5 Amplifikation der cDNA-Bank .....	43
11.6 Liste der erstellten cDNA-Banken .....	43
12. Screening von cDNA-Banken.....	43
12.1 Antikörperscreening .....	43
12.1.1 Verwendete Antiseren .....	46

12.2 Sondenscreening .....	48
12.3 <i>In vivo</i> -Excision .....	50
13. PCR-Techniken .....	50
13.1 PCR mit cDNA .....	51
13.2 PCR mit RNA .....	52
13.2.1 RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion) .....	52
13.2.2 5'-RACE (Rapid Amplifikation of cDNA Ends) .....	52
14. Klonierung von PCR-Fragmenten .....	54
14.1 Das pGEM-System .....	54
14.2 Das TOPO-System .....	55
15. DNA-Sequenzierung.....	55
16. Sequenzanalyse und Phylogenie .....	56
<b>C. Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
1. Die Hämocyane der Crustaceen.....	58
1.1 Das Hämocyanin des amerikanischen Hummers <i>Homarus americanus</i> .....	58
1.1.1 Biochemische Charakterisierung des Hämocyanins von <i>Homarus americanus</i> .....	58
1.1.2 N-terminale Sequenzen des Hämocyanins von <i>Homarus americanus</i> .....	60
1.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung des Hämocyanins von <i>Homarus americanus</i> .....	61
1.1.4 Identifizierung des Expressionsortes von Hämocyanin .....	64
1.2 Das Hämocyanin der Languste <i>Palinurus elephas</i> (synonym : <i>P. vulgaris</i> ).....	65
1.2.1 Biochemische Charakterisierung des Hämocyanins von <i>Palinurus elephas</i> .....	65
1.2.2 Molekularbiologische Charakterisierung des Hämocyanins von <i>Palinurus elephas</i> .....	67
1.3 Phylogenetische Auswertung der Hämocyaninsequenzen von Crustaceen.....	74
2. Die Hämocyane der Myriapoden .....	77
2.1 Biochemische Charakterisierung des Hämocyanins von <i>Spirostreptus spec.</i> .....	77
2.1.2 N-terminale Sequenzen des Hämocyanins von <i>Spirostreptus</i> .....	79
2.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung des Hämocyanins von <i>Spirostreptus</i> .....	79
2.2 Biochemische Charakterisierung des Hämocyanins von <i>Scutigera coleoptrata</i> (Chilopoda).....	82
2.2.2 N-terminale Sequenzen des Hämocyanins von <i>Scutigera coleoptrata</i> .....	83
2.2.3 Molekularbiologische Charakterisierung zweier Hämocyanin-Untereinheiten von <i>Scutigera coleoptrata</i> .....	84

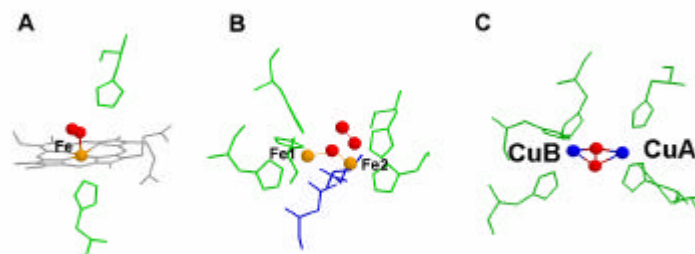
---

2.3 Phylogenetische Auswertung der Hämocyaninsequenzen von Myriapoden.....	89
3. Hämocyanin bei den Onychophora .....	92
3.1 Biochemische Charakterisierung des Hämocyanins von <i>Epiperipatus spec.</i> .....	92
3.2 Test auf Phenoxidaseaktivität .....	94
3.3 Molekularbiologische Charakterisierung des Hämocyanins von <i>Epiperipatus</i> .....	95
3.2. Phylogenetische Auswertung der Hämocyaninsequenz von Onychophoren .....	98
<b>D. Diskussion .....</b>	<b>101</b>
1. Die Hämocyanine der Crustacea .....	101
1.1 Die Evolution der Hämocyanin-Untereinheiten dekapoder Crustaceen .....	105
2. Die Hämocyanine der Myriapoden .....	107
2.1 Phylogenie des Myriapoden-Hämocyanins .....	109
3. Hämocyanin bei den Onychophora (Stummelfüßer) .....	111
3.1 Die Evolution des Hämocyanins der Onychophora.....	112
4. Evolution der Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoden .....	113
5. Molekulare Phylogenie der Proteine der Hämocyaninsuperfamilie.....	117
6. Ausblick.....	121
<b>E. Zusammenfassung .....</b>	<b>122</b>
<b>F. Anhang .....</b>	<b>123</b>
1. Verwendete Abkürzungen .....	123
2. Abkürzungscodes der Aminosäuren .....	125
3. IUPAC-Codes für degenerierte Nukleotide.....	125
4. Verwendete Primer.....	126
4.1 Degenerierte Primer.....	126
4.2 Spezifische Primer.....	127
5. Übersicht über alle ermittelten Hämocyanin-Untereinheiten .....	128
6. Multisequenz-Alignment .....	128
<b>G. Literatur.....</b>	<b>135</b>

## A. Einleitung

### 1. Respiratorische Proteine

Durch die Evolution sauerstofftransportierender Proteine konnten Tiere entstehen, die nicht mehr von den kurzen Diffusionswegen des Sauerstoffs abhängig waren. Diese respiratorischen Proteine haben die Fähigkeit, mit Hilfe von Metallionen wie Eisen- oder Kupferionen,  $O_2$  reversibel zu binden. Sie können dementsprechend als Sauerstofftransporter oder Sauerstoffspeicher dienen (Vinogradov, 1985; Terwilliger, 1998; Kurtz, 1999). Diese speziellen Proteine lassen sich in drei Typen einteilen: Globine, Hämerythrine und Hämocyane. Die Globine sind die wohl am besten untersuchten Atmungsproteine und kommen bei allen Tiergruppen vor. Sie treten nicht nur intrazellulär, sondern auch extrazellulär vor allem bei Wirbeltieren auf und binden den Sauerstoff mittels eines Eisenporphyrinringes (Dickerson und Geis, 1983; Hardison, 1996). In letzter Zeit konnten ganz neue Mitglieder dieser Proteinfamilie identifiziert werden (Burmester und Hankeln, 1999; Burmester *et al.*, 2000; Burmester *et al.*, 2002). Die Hämerythrine binden den Sauerstoff zwischen zwei Eisenatomen und kommen bei einigen marinen Anneliden sowie einigen kleineren Tierstämmen vor (Mangum, 1992). Die Hämocyane findet man bei Mollusken und Arthropoden; sie besitzen kupferhaltige Sauerstoffbindungscentren (Abb. 1) (z.B. van Holde und Miller, 1995; Markl und Decker, 1992). Molluskenhämocyanin unterscheidet sich grundlegend vom Arthropodenhämocyanin (Markl, 1986); die vorliegende Arbeit befaßt sich ausschließlich mit letzterem.



**Abb 1:** Struktur der Sauerstoffbindungscentren von Globinen (A), Hämerythrin (B) und Hämocyanin (C). Die Sauerstoffatome sind rot, die Eisenatome orange und die Kupferatome blau gezeichnet (nach Burmester, 2000).



## 2. Die Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden

**Hämocyanine:** Hämocyanin ist das respiratorische Protein vieler Cheliceraten, Crustaceen und Myriapoden. Es ist extrazellulär und flottiert frei in der Hämolymphe. Es kommt in der Hämolymphe in sehr hohen Konzentrationen vor und konnte deshalb schon vor vielen Jahren näher charakterisiert werden (Kobert, 1903; Quagliariello, 1923). Hämocyanin ist in der Lage, Sauerstoff reversibel zwischen zwei Kupferionen zu binden und wieder abzugeben (Abb 1B). Es besteht grundsätzlich aus mehreren Untereinheiten, die sich zu großen Makromolekülen zusammenlagern und zeigt im isolierten Zustand eine charakteristische blaue Färbung (Markl und Decker, 1992). Obwohl die Hämocyanine von Arthropoden und Mollusken in ihren Kupferbindungsstellen gewisse Ähnlichkeiten aufweisen (Cuff *et al.*, 1998), kann man davon ausgehen, dass sie nicht gleichen Ursprungs sind. So unterscheiden sie sich in ihrer Primär-, Tertiär- und Quartärstruktur grundlegend (van Holde und Miller, 1995; Markl und Decker, 1992). Nach statistischen Auswertungen von Sequenzvergleichen konnte gezeigt werden, dass eine phylogenetische Verwandtschaft dieser respiratorischen Proteine unwahrscheinlich ist (Burmester, 2001; van Holde *et al.*, 2001). Die Hämocyanine der Arthropoden sind Mitglieder einer Proteinsuperfamilie, zu der auch einige nichtrespiratorische Proteine gehören (Übersichtsartikel: Beintema *et al.*, 1994; Burmester und Scheller, 1996; Burmester, 2001). Im Folgenden werden diese beschrieben.

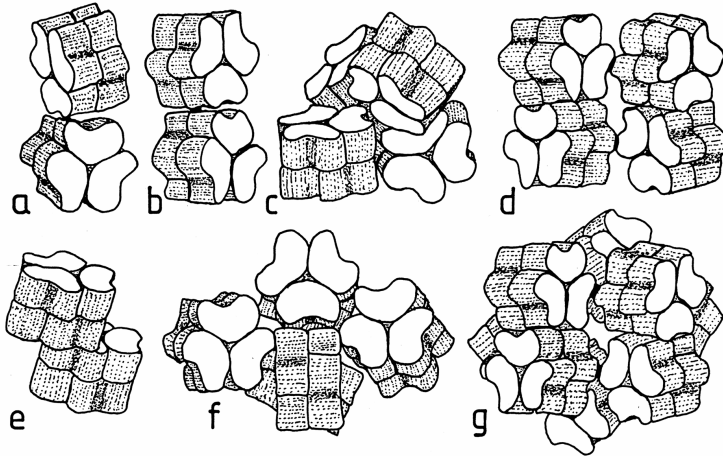
**Phenoloxidasen:** Die Phenoloxidasen sind an der humoralen Immunantwort, der Sklerotisierung der Kutikula und der Wundheilung der Arthropoden beteiligt. Es handelt sich bei ihnen um sauerstoffumsetzende Enzyme des Melaninstoffwechsels (z.B. Åspan und Söderhall, 1991; Söderhall und Cerenius, 1998). Sie werden als sogenannte Zymogene synthetisiert (Prophenoloxidase, PPO) und durch Abspaltung eines N-terminalen Peptids aktiviert (Åspan *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1995; Söderhall und Cerenius, 1998). Dieses Enzym fehlt bei den Cheliceraten, kommt aber bei Crustaceen, Myriapoden und Insekten vor. Phenoloxidasen und Hämocyanine besitzen sehr ähnliche aktive Zentren und unter bestimmten Umständen können auch einige Hämocyanine eine Phenoloxidaseaktivität entwickeln (Decker und Tucek, 2000; Decker *et al.*, 2001).

**Pseudohämocyanine:** Die Pseudohämocyanine sind nicht-respiratorische Proteine (NRPs), die bei verschiedenen dekapoden Crustaceen gefunden und auf Sequenzebene charakterisiert wurden („NRPs“; Markl *et al.*, 1979; Burmester, 1999; Terwilliger, 1999). Sie besitzen keine Kupferbindungsstellen und transportieren dementsprechend keinen Sauerstoff. Da sie von ihrer Aminosäuresequenz her mit den Hämocyaninen nahe verwandt sind, werden sie als „Pseudohämocyanine“ oder „Cryptocyanine“ bezeichnet. Die Präsenz dieser Proteine in der Hämolymphe ist vom Häutungszyklus der Tiere abhängig und man vermutet deshalb eine Speicherfunktion (Burmester, 1999; Terwilliger *et al.*, 1999).

**Hexamerine und Hexamerinrezeptoren:** Die Hexamerine und ihre Rezeptoren der Insekten haben ihr Kupferbindungszentrum und damit die Fähigkeit zur Sauerstoffbindung verloren. Die Hexamerine dienen offenbar als Speicherprotein, z.B. bei der Häutung, während die membranständigen Hexamerinrezeptoren für die Aufnahme von Hexamerinen aus der Hämolymphe durch den larvalen Fettkörper verantwortlich sind. Sequenzanalysen zeigen, dass sie mit den Hämocyaninen nahe verwandt sind (Telfer und Kunkel, 1991; Markl *et al.*, 1992; Burmester und Scheller, 1996).

### 3. Allgemeiner Aufbau des Arthropoden Hämocyanins

Arthropodenhämocyanine sind aus Hexameren aufgebaut, die aus sechs identischen oder ähnlichen Untereinheiten mit jeweils 620 bis 660 Aminosäuren bestehen (Markl, 1986). Eine Untereinheit hat dementsprechend eine Molekülmasse von etwa 70 bis 80 kDa und das Hexamer besitzt einen Durchmesser von etwa 10 nm (1x6) (Markl, 1986). Die Hexamere assoziieren zu unterschiedlichen Quartärstrukturen von 2x6 bis zu 8x6 (Abb. 2) (Markl, 1986). Durch diese Quartärstruktur kommt auch die Kooperativität zustande, bei der die Beladung einer Untereinheit mit Sauerstoff die Beladung der anderen Untereinheiten erleichtert und begünstigt (Übersichtsartikel: Markl und Decker, 1992). Hämocyanin ist in der Lage, ein O<sub>2</sub>-Molekül zwischen zwei Kupferionen, die wiederum mit je drei Histidinen koordiniert sind, reversibel zu binden (Linzen *et al.*, 1985; Markl und Decker, 1992; van Holde und Miller, 1995). Die Kupferbindungscentren sind vom sogenannten „Typ III“ (van Holde *et al.*, 2001). Die Sauerstoffbindung der meisten Arthropodenhämocyanine ist durch eine moderate bis schwache Sauerstoffaffinität, eine hohe Kooperativität und einen Bohr-Effekt charakterisiert (Loewe *et al.*, 1978; Mangum 1980, 1983, 1985; van Holde und Miller, 1982; Ellerton, 1983). Schon seit vielen Jahren werden die Hämocyanine der Chelicerata und der malakostraken Crustacea intensiv untersucht, und in letzter Zeit wurden auch die Hämocyanine in Myriapoda (Mangum *et al.*, 1985; Gebauer und Markl, 1999; Jaenicke *et al.*, 1999) und Hexapoda (Sánchez *et al.*, 1998) näher analysiert.

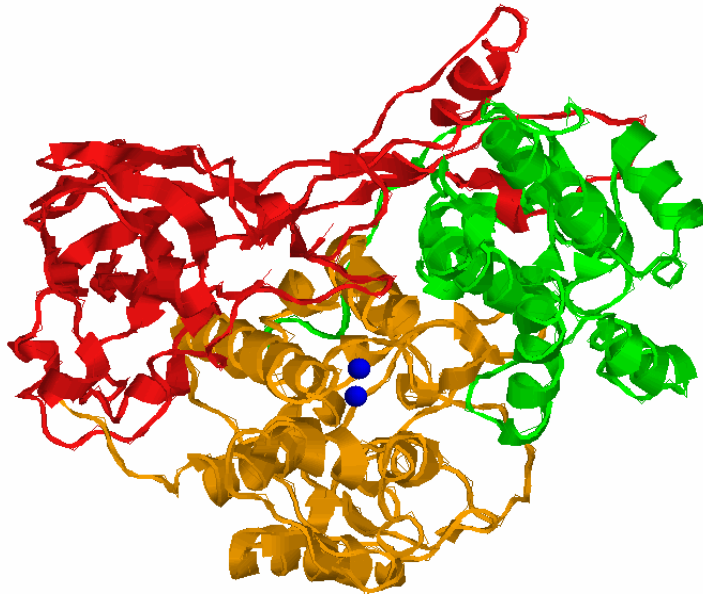


**Abb 2 : Quartärstruktur verschiedener Arthropodenhäemocyanine (nach Markl und Decker, 1992)**

(a) Typisches 2 x 6 Hc vieler Dekapoda (z.B. *Homarus americanus*), (b) 2 x 6 Hc vieler Spinnen (z.B. *Cupienius salei*), (c) 4 x 6 Hc einiger Garnelen (z.B. *Callinassa californiensis*), (d) typisches 4 x 6 Hc von *Eurypelma californicum* (Arachnida), (e) 2 x 6 Hc von *Squilla mantis* (Crustacea: Hoplocarida), (f) 6 x 6 Hc der Myriapoda (*Scutigera coleoptrata*), (g) 8 x 6 Hc der Xiphosura (z.B. *Limulus polyphemus*)

Aufgrund der Daten von Röntgenstrukturanalysen des Häemocyanins der Languste *Panulirus interruptus* (Gaykema *et al.*, 1984; Volbeda und Hol, 1989) stellte man fest, dass die Untereinheiten bohnenförmig sind und sich in drei Domänen unterteilen lassen (Abb. 3). Die Domäne 1 besteht aus einem Bündel von  $\alpha$ -Helices und umfasst etwa 150 bis 180 Aminosäuren. Man vermutet, dass die Domäne 1 für die Kooperativität der Sauerstoffbindung wichtig ist, da sie das aktive Zentrum schützt. Im Zentrum von Domäne 2 (etwa 220 Aminosäuren) befindet sich das Sauerstoffbindungszentrum, das zwei Kupferionen trägt. Die Domäne 2 ist ebenfalls aus  $\alpha$ -Helices aufgebaut, deren antiparallele Anordnung typisch für globuläre Proteine ist (Presnell und Cohen, 1989). Charakteristisch für die dritte Domäne ist die  $\beta$ -Faltblattstruktur, die ein siebensträngiges, antiparalleles „Beta-Barrel“ bildet (Volbeda und Hol, 1989). Sie besteht aus ca. 260 Aminosäuren und ihr wird die Stabilisierung

der gesamten Tertiärstruktur des Makromoleküls zugeschrieben (Markl und Decker, 1992).

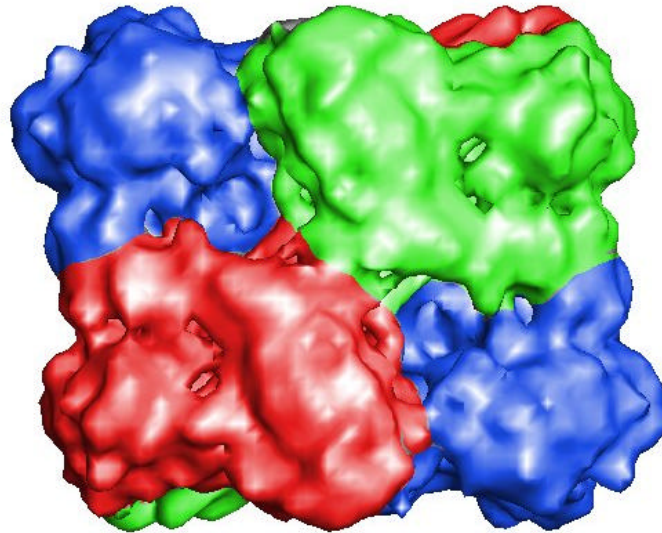


**Abb. 3: Röntgenstruktur einer Untereinheit des Hämocyanins von *Palinurus interuptus***

Die Domänen sind in verschiedenen Farben dargestellt, die zentralen Kupferionen sind blau. Beschreibung siehe Text. Grün = Domäne 1; Orange = Domäne 2; Rot = Domäne 3

### 3.1 Das Hämocyanin der Crustacea

Das Hämocyanin vieler verschiedener Crustaceen ist schon seit langem auf immunologischer und biochemischer Basis sehr gut untersucht (Stöcker *et al.*, 1988; Markl *et al.*, 1979, Markl, 1986; Markl und Decker, 1992). Bei den Crustaceen existieren Hämocyanine von 1x6 (z. B. *Palinurus elephas*, Isopoda) über 2x6 (z. B. *Homarus americanus*, *Astacus leptodactylus*) bis zu 4x6 (z. B. *Callinassa californiensis*). Die immunologisch unterschiedlichen Typen von Untereinheiten wurden mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet (Markl und Kempfer, 1981; Markl, 1986). Bei den Untereinheiten der Crustaceen gibt es eine hohe Variabilität und sie können selbst zwischen nahe verwandten Spezies stark variieren. Außerdem werden manche Untereinheiten vermutlich nur in bestimmten Entwicklungsstadien oder unter spezifischen physiologischen Bedingungen exprimiert (Markl und Decker, 1992; Durstewitz und Terwilliger, 1997; Terwilliger, 1998). Bisher konnten nur Hämocyaninsequenzen des  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Typs ermittelt werden. Vom 1x6 Hämocyanin der Languste *Palinurus elephas* wurde kürzlich eine 3D-Rekonstruktion mit einer Auflösung von 8,5 Å erzielt (Abb. 4) (Meissner *et al.*, in Vorbereitung).

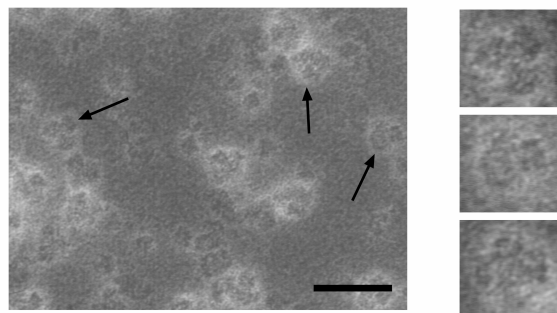


**Abb 4: 3D-Rekonstruktion des 1x6 Hämocyanins von *Palinurus elephas* mit 8.5Å Auflösung**

Die 3D-Rekonstruktion wurde aus 9 970 kryo-elektronenmikroskopischen Einzelbildern erstellt. Die einzelnen Untereinheiten sind farbig abgesetzt. Das gesamte Molekül hat eine Masse von etwa 480 kDa (Meissner *et al.*, in Vorbereitung). Es wurde eine Auflösung von 8,5 Å erreicht. Die Sequenz des Langusten Hämocyanins konnte zudem auf die bekannte Röntgenstruktur modelliert werden. Dabei bestätigten sich die Ergebnisse der Kryoelektronenmikroskopie und der Röntgenstrukturanalyse gegenseitig.

### 3.2. Das Hämocyanin der Myriapoda

Lange Zeit nahm man an, dass die Sauerstoffversorgung der Gewebe der Myriapoda ausschließlich über Tracheen erfolgt (Brusca und Brusca, 1990; Hilken, 1998). Mangum *et al.* entdeckten 1985 beim Spinnenläufer *Scutigera coleoptrata* (Chilopoda) ein Hämocyanin und führten das Vorhandensein eines respiratorischen Proteins bei diesem Tier auf dessen spezielles, blind endendes Tracheensystem und die hohe Aktivität der Tiere zurück (Mangum und Godette, 1986; Mangum *et al.*, 1985). Hämocyanin galt jedoch keinesfalls als universelles Merkmal der Myriapoda. Erst im Rahmen neuerer Untersuchungen konnte bei dem Diplopoden *Spirostreptus spec.* ein Hämocyanin biochemisch nachgewiesen und charakterisiert werden (Jaenicke *et al.*, 1999). Es handelt sich wie bei *Scutigera coleoptrata* um ein 6x6-Hämocyanin, das in erstaunlich hoher Konzentration in der Hämolymphe der untersuchten Tiere vorliegt und diesem auch strukturell sehr ähnlich ist (Abb. 5). Das Hämocyanin von *Spirostreptus* zeichnet sich durch eine hohe Sauerstoffaffinität ( $P_{50} = 4.7$  Torr) und eine niedrige Kooperativität aus ( $h = 1.3 \pm 0.2$ ). Aufgrund der vorliegenden Daten kann man annehmen, dass Hämocyanin als respiratorisches Protein innerhalb der Myriapoda weiter verbreitet ist, als bisher angenommen.



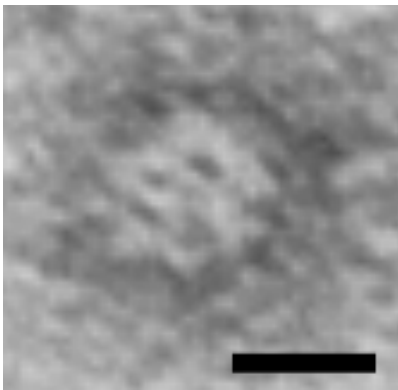
**Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Hämolympheproteine von *Spirostreptus spec.***

Hämolympheproteine von *Spirostreptus spec.* wurden im Elektronenmikroskop untersucht. Der Balken entspricht 50 nm. Die Pfeile markieren hämocyaninähnliche Partikel. Auf der rechten Seite sind die Aufnahmen in einer zweifachen Vergrößerung gezeigt (nach Jaenicke *et al.*, 1999).



### 3.3. Hämocyanin bei Onychophora ?

Bei den Onychophora oder Stummelfüßern handelt es sich um eine äußerst seltene Tiergruppe. Ihre phylogenetische Position im Verhältnis zu den Arthropoden ist bisher nicht genau geklärt. Von einigen Autoren werden ihre Vorfahren aus morphologischer Sicht als Verwandte von Plattwürmern oder Mollusken angesehen (Hou und Bergström, 1995). Andere sehen sie aufgrund molekularer Daten als Proarthropoda (Regier und Shultz, 2001). Sie verfügen, wie die Myriapoda, über ein sehr gut ausgebildetes Tracheensystem und die Existenz eines respiratorischen Proteins war bislang sehr umstritten (Ellerton *et al.*, 1983). Es gibt seit kurzer Zeit jedoch Hinweise auf das Vorhandensein eines hämocyaninähnlichen Proteins in der Hämolymphe dieser Tiere (Burmester, unveröffentlicht) (Abb. 6). Eine wichtige Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, diese Vermutung biochemisch und molekularbiologisch zu verifizieren.



**Abb. 6: Hämocyaninähnliches Molekül in den Onychophoren (*Epiperipatus spec.*)**

Hämolympheproteine von *Epiperipatus spec.* wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Der Balken entspricht 10 nm (EM Aufnahme: J. R. Harris)

#### 4. Biosyntheseorte des Hämocyanins

Über die Biosynthese des Hämocyanins ist nur bei einigen Spezies genaueres bekannt. Die Konzentration an Hämocyanin im Blut der untersuchten Tiere schwankte zwischen 20 und 100 mg/ml und scheint abhängig zu sein von physiologischen Bedingungen, Häutung und Entwicklungsstadium (Senozan und Briggs, 1989; Hagermann, 1983). Bei dem Pfeilschwanz *Limulus polyphemus* wird das Hämocyanin in speziellen Zellen, den Cyanocyten, synthetisiert (Fahrenbach, 1970). Bei Vogelspinnen wurden hämocyaninbildende Zellen in der inneren Herzwand nachgewiesen (Kempfer, 1983; Markl *et al.*, 1990) und mRNA, die für Hämocyanin kodiert konnte aus diesen Zellen isoliert werden (Voit und Schneider, 1986; Voit *et al.*, 2000). Bei Crustaceen wurden Cyanocyten in den Augenstielen von *Squilla mantis* gefunden (Schönenberger, 1980) und bei dekapoden Crustaceen wurde die Mitteldarmdrüse als Biosyntheseort des Hämocyanins identifiziert (Jacobs *et al.*, 1984; Preaux *et al.*, 1986; Senkbeil und Wriston, 1981). Auch bei der Sekretion des Hämocyanins in die Hämolymphe gibt es Unterschiede. Während bei Cheliceraten das Protein durch ein Aufplatzen der blutbildenden Zellen freigegeben wird, benötigt das Hämocyanin von Crustaceen ein Signalpeptid, um ins Blut abgegeben zu werden (Voit *et al.*, 2000; Mangum *et al.*, 1985; Markl and Decker, 1992; van Holde and Miller, 1995). Über den Biosyntheseort des Myriapodenhämocyanins ist bislang nichts bekannt.

#### 5. Funktion des Hämocyanins

Hämocyanin ist in erster Linie ein Sauerstofftransporter. Darüber hinaus konnten jedoch zusätzliche Funktionen dieses Proteins gezeigt werden. So werden in der Literatur Aufgaben im Bereich der Sauerstoffspeicherung oder eine osmoregulatorische Funktion diskutiert (van Holde *et al.*, 2001). Darüber hinaus beschreiben manche Autoren auch Enzymfunktionen des Hämocyanins (Übersichtsartikel: Markl und Decker, 1992). Auch wird vermutet, dass Hämocyanin bei Cheliceraten an der Immunantwort beteiligt ist und die dort fehlende Phenoloxidase ersetzt (Decker und Riemke, 1998; Nagai und Kawabata, 2000; Decker *et al.*, 2000). Kürzlich wurden Peptide gefunden, die als Spaltprodukt des C-terminalen Endes der Hämocyaninsuntereinheit der Garnele *Penaeus vanamei* eine Fungizid-Wirkung zeigen (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2001).

## 6. Hämocyanine und Evolution

Wie schon erwähnt, haben die Hämocyanine der Arthropoden und Mollusken trotz des gleichen Namens offenbar keinen gemeinsamen Ursprung sondern entwickelten sich unabhängig voneinander aus altertümlichen Kupfer-Proteinen (Markl und Decker, 1992; Burmester, 2001; van Holde *et al.*, 2001). Die ersten Proteine der Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoden, die vor etwa 600 Millionen Jahren entstanden, waren wahrscheinlich den Phenoloxidasen sehr ähnlich. Das Entstehen eines einheitlichen, Arthropoden-typischen Enzyms, das in den Melaninstoffwechsel und die Sklerotisierung der Kutikula involviert war und ist, könnte mit der Evolution eines harten Exoskeletts im späten Präkambrium verbunden gewesen sein (Burmester, 2001). Tyrosinasen mit ähnlichen Funktionen wie die der Phenoloxidasen bei Arthropoden kommen in allen Tierstämmen vor, unterscheiden sich jedoch grundlegend in ihrer Sequenz und 3D-Struktur (Drexel *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1988; Markl und Decker, 1992; Burmester, 2001). Hämocyanin kann man in allen Großgruppen der Arthropoden finden. Dementsprechend existierte es vermutlich bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren der Chelicerata, Crustacea, Myriapoda und Insecta (Burmester, 2001). Die Hämocyaninuntereinheiten sind innerhalb der Arthropoden-Unterklassen sehr divergent. Man kann davon ausgehen, dass diese Differenzierung bei Crustaceen, Cheliceraten und Myriapoden jeweils unabhängig abgelaufen ist (Markl, 1986; Burmester, 2001).

Innerhalb der Arthropoda ist vor allem die Position der Myriapoda umstritten. Bis Anfang der neunziger Jahre war die „Tracheata“-Hypothese stark favorisiert und hat sich bis heute in den meisten Lehrbüchern gehalten. Sie besagt, dass die Myriapoda zusammen mit den Insecta ein gemeinsames Taxon bilden (Snodgrass, 1938; Brusca und Brusca, 1990). Es wird jedoch auch ein Schwestergruppenverhältnis der Myriapoda mit allen anderen Arthropoda postuliert (Turbeville *et al.*, 1991; Ballard *et al.*, 1992). Molekulare Daten sprechen jedoch eher für ein Schwestergruppenverhältnis der Myriapoda mit den Chelicerata (Friedrich und Tautz, 1995; Giribet *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 2001). Auch die genaue Stellung der Hexapoda ist in diesem Zusammenhang unklar. Es deuten immer mehr Daten auf ein Schwestergruppenverhältnis der Crustacea mit den Hexapoda hin (Friedrich und Tautz, 1995; Boore *et al.*, 1998; Burmester, 2001). Auch die relative Stellung der Onychophora im Stammbaum der Arthropoda ist höchst unsicher.

## **7. Ziel dieser Arbeit**

Hämocyanin eignet sich, wie auch schon in früheren Analysen gezeigt werden konnte, als ein hervorragender Marker, um evolutive Veränderungen der Hämocyaninsuperfamilie und der Arthropoden nachvollziehen zu können (Burmester, 2001; Burmester, 2002). Es lagen zu Beginn meiner Arbeit etwa 100 Sequenzen dieser Proteinsuperfamilie vor. Bisher existierten allerdings nur Sequenzdaten der Hämocyanine von Crustaceen und Cheliceraten, während Sequenzdaten der Myriapoden und Onychophoren komplett fehlten. Deshalb sollte ich im Rahmen meiner Arbeit vor allem die Hämocyanine der Myriapoda und Onychophora näher untersuchen und zusätzlich noch weitere Crustaceenhämocyanine sequenzieren. Die Ergebnisse sollten in eine ausführliche phylogenetische Analyse aller Mitglieder der Hämocyaninsuperfamilie einfließen.

## **B. Material und Methoden**

### **1. Tiere**

#### **1.1 Crustacea**

***Homarus americanus* und *Palinurus elephas***: Arthropoda, Crustacea, Eucarida, Decapoda

Beide Crustaceenarten sind schreitende Krebse, die am Seeboden und im Felslitoral in Spalten, Nischen und Höhlen bis in etwa 70 m Tiefe vorkommen.

Der amerikanische Hummer (Abb. 7) hat sein Verbreitungsgebiet an der Ostküste Nordamerikas und trägt typischerweise an Stelle des ersten Schreitbeinpaars große, kräftige Scheren. Die europäische Languste *Palinurus elephas* (= *Palinurus vulgaris*) ist im Mittelmeer sowie im Atlantik verbreitet. Ihr fehlen an allen Schreitbeinen Scheren und die Hinterleibssegment sind mit zuweilen sehr scharfen Stacheln besetzt. Die Crustaceen wurden bei einem lokalen Fischhändler („Fisch Jakob“) in Mainz gekauft.



**Abb. 7: *Homarus americanus***

## 1.2 Myriapoda

***Spirostreptus spec.***: Arthropoda, Myriapoda, Diplopoda, Juliformes.

Bei den Diplopoden (Abb. 8) handelt es sich um langgestreckte, z.T. beachtlich große Bodenbewohner, deren Verbreitungsgebiet von den Tropen bis in trockene Biotope wie Wüsten reicht. Sie haben einen mit Kalk verstärkten Panzer, der ihnen beim Wühlen in der Erde hilft. Sie ernähren sich hauptsächlich von verrottendem Pflanzenmaterial. Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Tausendfüßer stammt aus Kenia und wird bis zu 15 cm lang. Das erste Beinpaar der Männchen ist zu einem Gonopoden umgewandelt.



Abb. 8: *Spirostreptus spec.*

***Scutigera coleoptrata***: Arthropoda, Myriapoda, Chilopoda, Scutigeraomorpha

Die Chilopoda (Abb. 9) sind hingegen sehr schnelle und bewegliche Tiere. Das erste Rumpfpaar ist zu auffälligen, großen Beißzangen umgeformt. Der Körper von *Scutigera* besteht aus 22-25 Segmenten und die untersuchten Tiere zeichnen sich durch extrem lange Beine aus. Auch die Chilopoda bewohnen relativ trockene bis sehr feuchte Gebiete. Die Diplopoden wurden uns freundlicherweise vom Aquazoo Düsseldorf zur Verfügung gestellt, während die Chilopoden in Griechenland von Herrn Dr. Wolfgang Gebauer, in Deutschland (Geisenheim) von Frau Barbara Laufs und in Italien (Giglio) von Frl. Julia Markl gefangen wurden.



Abb. 9: *Scutigera coleoptrata*

### 1.3 Onychophora

***Epiperipatus spec.***: Proarthropoda, Onychophora, Peripatida

Bei den Onychophora (Abb. 10) handelt es sich um eine äußerst seltene Tiergruppe. Ihr Vorkommen erstreckt sich von den Regenwäldern Costa Ricas bis nach Neuseeland in eher kälteren Regionen. Die Tiere leben versteckt unter Laub oder Steinen und können ein sehr wirkungsvolles Wehrsekret abgeben, das ein verdauendes Enzym enthält und somit auch zum Fangen der Beute dient. Die Onychophora stammen aus der Zucht von Frau Dr. Hilke Ruhberg aus Hamburg.



Abb. 10: *Epiperipatus spec.*

## 1.4 Hälterung

Über längere Zeit wurden nur Diplopoden und Onychophoren gehältert. Die Diplopoden wurden unter konstanten Temperaturen (28°C) und bei hoher Luftfeuchtigkeit in Terrarien der Größe 40 x 40 cm auf Blumenerde gehalten und mit Kartoffeln gefüttert. Auch Kadaver von Grillen und Heuschrecken wurden als Ergänzung zugefüttert. Die Onychophoren brauchen ebenfalls eine hohe Luftfeuchtigkeit, jedoch Temperaturen um etwa 18°C. Als Futter dienten Grillen entsprechender Größe.

## 1.4 Tierschutzaspekte

Onychophoren stehen in ihrer Heimat Costa Rica und Neuseeland unter Naturschutz und sind dementsprechend selten. Die untersuchten Tiere stammen jedoch aus einer deutschen Nachzucht und konnten deshalb unbedenklich verwendet werden.

## 2. Verwendete Chemikalien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bezogen und stammten, wenn nicht anders angegeben von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Boehringer (Mannheim) und Sigma (Deisenhofen). Die Kits wurden von den Firmen Stratagene (Heidelberg), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), Peqlab (Erlangen), Invitrogen (Groningen) und Sigma Aldrich (Darmstadt) bezogen.

Folgende Geräte wurden, wenn nicht anders angegeben, benutzt :

<b>Zentrifugen :</b>	Heraeus Biofuge pico, Rotor 3325 (Kendro GmbH, Hanau) Heraeus Megafuge 1.0R, Rotor 3360 Speed Vac Concentrator (Bachofer, Reutlingen) Airfuge (Beckman Instruments GmbH, München)
<b>Photometer :</b>	Ultrospec Plus (Pharmacia LKB, Freiburg) Biophotometer (Eppendorf, Köln)
<b>Elektronenmikroskop :</b>	Zeiss EM 420



---

<b>Autoklav :</b>	Technoclav (Integra Biosciences, Fernwald)
<b>PH-Meter :</b>	Digital-pH-Meter (Knick, Berlin)
<b>Thermocycler :</b>	Techne Progene (Techne, Cambridge, UK) Biometra T-Gradient (Biometra, Göttingen)

### **3. Allgemeine proteinbiochemische Methoden**

#### **3.1 Entnahme der Hämolymphe**

Die Tiere wurden zur Betäubung 1-2 Std. auf Eis gelegt und die Hämolymphe danach mit einer sterilen Kanüle entnommen. Bei den Crustaceen wurde die Hämolymphe am abdominalen Sinus und bei den Myriapoden dorsal entnommen. Bei den Onychophora wurde aufgrund ihrer nicht sklerotisierten Haut, dem Wehrsekret und der sehr geringen Menge an Hämolymphe, das Blut mit einer ausgezogenen Mikrokapillare entnommen. Anschließend wurde die Hämolymphe sofort bei 4°C, 13 000 g, 10 min, abzentrifugiert, um die Blutzellen zu sedimentieren.

#### **3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Für die Charakterisierung der Hämolymphe war es notwendig, den Proteingehalt der Proben genau zu bestimmen. In den meisten Fällen wurde eine photooptische Messung bevorzugt; der Proteingehalt konnte aber auch mit der Methode nach Bradford bestimmt werden.

##### **3.2.1 Extinktionsmessung**

Entsprechend des Gehaltes einer Proteinlösung an aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) absorbiert diese Licht im ultravioletten Bereich zwischen 200 und 300 nm. Durch die photooptische Proteinbestimmung bei 280 nm läßt sich der Proteingehalt einer Lösung folglich grob abschätzen. Dabei geht man davon aus, dass 1 OD bei einer Schichtdicke von 1 cm etwa 1 mg/ml Hämocyanin entspricht (Markl, 1980). Hämocyanin hat ein zweites Absorptionsmaximum bei 340 nm, was den oxigenierten Zustand des Moleküls kennzeichnet und durch den Kupfer-Sauerstoff-Kupfer-Komplex zustande kommt. Die blaue Farbe des Hämocyanins wird

außerdem durch ein weiteres Absorptionsmaximum des Kupfer-Komplexes im sichtbaren Bereich bei ca. 560 nm erzeugt.

### **3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Durch die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) an Proteine wird unter sauren Bedingungen das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschoben. Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit eignet sich diese Methode zur Bestimmung kleiner Proteinmengen im Bereich von 2 bis 16 µg.

#### **Bradford-Lösung**

100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva) wurden in 50 ml 95% Ethanol p.a. gelöst, 100 ml 85%  $H_3PO_4$  hinzugegeben und die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur aufbewahrt.

#### **Durchführung**

100 µl der Proteinlösung wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und nach 5 min die Extinktion bei 595 nm photometrisch gemessen. Als Standard diente Rinder Serum Albumin (BSA).

### **3.3 Dialyse**

Um niedermolekulare Verunreinigungen und Salze aus einem Proteingemisch abzutrennen und um außerdem das Hämocyanin in seine Untereinheiten zu spalten wurde eine Dialyse gegen Gly-OH durchgeführt. Dazu wurde die Hämolymphe 1:2 mit Gly-OH-Puffer (7 mol/l Harnstoff, 10 g/l Glycin, PH 9.6) verdünnt und über Nacht bei 4°C unter leichtem Rühren in einem Dialyseschlauch, bzw. -gefäß in eine Harnstofflösung gehängt. Partikel oberhalb der Ausschlußgröße der Dialysemembran konnten diese nicht passieren und wurden zurückgehalten, während kleinere Moleküle frei diffundieren konnten.

### 3.4 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) kann man Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld auftrennen. Acrylamid ist nach Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und durch eine Katalyse mit Tetramethylethyldiamin (TEMED) in der Lage lange Ketten zu bilden, die dann durch Zugabe von N,N'-Methylenbisacrylamid miteinander vernetzt werden. Je nach Konzentration von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid entstehen Netze bestimmter Porengröße, in denen dementsprechend Proteine unterschiedlicher Größe und Ladung voneinander aufgetrennt werden können.

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine durch das Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) bei von 95°C, 5 min denaturiert. SDS maskiert zudem die Eigenladung der Proteine durch eine negativ geladene Hülle, so dass die Proteine unabhängig ihrer Ladung nur aufgrund ihrer Größe im Gel aufgetrennt werden. Die zurückgelegte Strecke der Proteine im Gel ist in etwa linear vom dekadischen Logarithmus der Molekülgrößen abhängig und lässt sich anhand von mitgelaufenen Markerproteinen bestimmen. Es wurde ausschliesslich das System nach Laemmli verwendet.

Bei der nativen PAGE werden die Proteine nicht durch Zugabe von SDS,  $\beta$ -Mercaptoethanol und durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Sie bleiben somit in einem nativen Zustand und werden in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse, ihrer spezifischen Eigenladung und ihrer Tertiärstruktur elektrophoretisiert.

#### Gelzusammensetzung (SDS-PAGE)

a) Trenngelgemisch für 4 Minigele

	5%	7,5%	10%	12,5%
<b>30% Acrylamid</b>	3,3 ml	5 ml	6,6 ml	8,3 ml
<b>Trenngelpuffer mit SDS</b>	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	11,6 ml	9,9 ml	8,3 ml	6,6 ml
<b>TEMED</b>	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l
<b>APS (10%)</b>	130 $\mu$ l	130 $\mu$ l	130 $\mu$ l	130 $\mu$ l

## b) Sammelgelgemisch für 4 Minigele (SDS-PAGE)

	<b>3,9 %</b>
<b>30% Acrylamid</b>	1,3 ml
<b>Sammelgelpuffer mit SDS</b>	2,5 ml
<b>H2O dest</b>	6,2 ml
<b>TEMED</b>	10 µl
<b>APS (10%)</b>	100 µl

## Lösungen :

## · Trenngelpuffer (pH 8,8)

1,5 M        Tris  
0,4% (w/v)    SDS

## · Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,5 M        Tris  
0,4% (w/v)    SDS

## · Elektrophorese-Laufpuffer (pH ca. 8,3)

23 mM        Tris  
190 mM       Glycin  
0,2% (w/v)    SDS

## Gelzusammensetzung (native PAGE)

	<b>Trenngel 5%</b>	<b>Sammelgel</b>
<b>30% Acrylamid</b>	1.65 ml	1.3 ml
<b>Lsg. B</b>	3.75 ml	-
<b>Lsg. C</b>	-	1.2 ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1.2 ml	7.5 ml
<b>TEMED</b>	7.5 µl	10 µl
<b>APS (10%)</b>	450 µl	300 µl

### 3.5 Coomassie-Färbung

Die Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue an Proteine. Es können Proteinmengen ab ca. 0,5 µg pro Bande im SDS-Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden.

Zur Färbung wurde das Gel nach der Elektrophorese 1 bis 2 h gefärbt und anschließend entfärbt, um die Hintergrundfärbung wieder zu entfernen.

#### Lösungen :

##### · Lösung B (pH 7.6)

60 mM Borsäure

1,32 mM Tris

mit H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen

##### · Lösung C (pH 7.6)

1 M Tris

mit H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen

##### · Elektrophorese-Laufpuffer

12 mM Borsäure

264 mM Tris

mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen

##### Färbelösung (1000 ml) :

400 ml Methanol

125 ml Essigsäure

auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

auffüllen

2g Coomassie Brilliant Blue R-250

##### Entfärber (1000 ml) :

200 ml Isopropanol

116 ml Essigsäure

auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O

Aufbewahren der Gele in 7% iger Essigsäure.

## 4. Blottingmethoden

### 4.1 „Semidry“ Westernblot

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen wurde ein „semidry“ Westernblot nach Kyhse-Andersen (1984) durchgeführt. Bei diesem Transfer wandern die Proteine beim Anlegen einer Spannung in Richtung der Anode und werden auf der dazwischen liegenden Membran immobilisiert. Nach dem Transfer konnten die gebundenen Proteine mit Ponceau S reversibel angefärbt werden (siehe B 4.2). Danach wurden häufig Detektionen der Proteine mit spezifischen Antikörpern durchgeführt, die in einer Farbreaktion mit NBT/BCIP nachgewiesen werden konnten (siehe B 12.1).

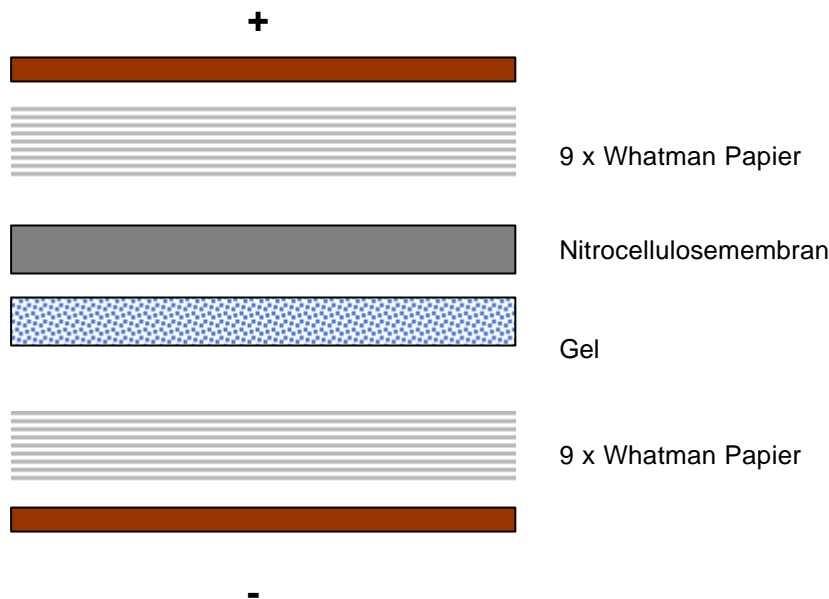
Der Aufbau eines Westernblots ist in Abb. 11 gezeigt.

<b>Transferpuffer</b>	39 mM Glycin
	48 mM Tris
	0.037% SDS
	20% Methanol
	pH 8.3

#### 4.1.1 PonceauS-Färbung

Für diese reversible Färbung wurden die Nitrocellulose-Streifen nach dem Transfer für etwa 1 bis 2 min in die PonceauS Arbeitslösung gelegt und überschüssige Färbelösung mit H<sub>2</sub>O dest. abgewaschen.

Die Färbung störte nicht bei nachfolgenden Detektionsschritten.

**Abb. 11: Aufbau eines „semidry“ Westernblots**

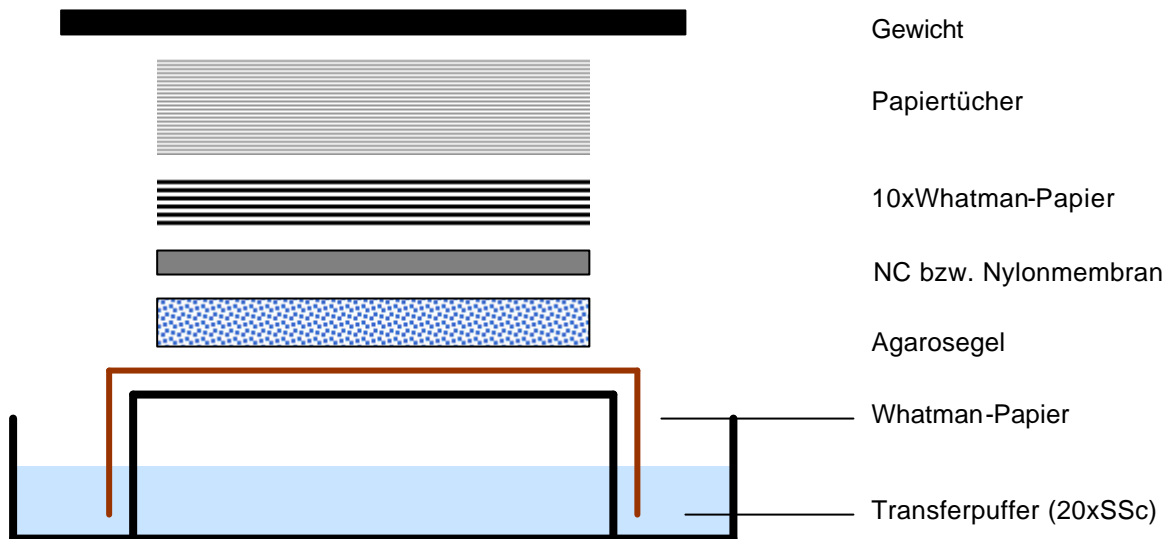
Die Whatman-Papiere sowie die Nitrocellulosemembran wurden mit Transferpuffer getränkt.

Die erste Schicht des Blots bildeten die Whatman-Papiere, auf die luftblasenfrei das SDS-Gel und die Nitrocellulosemembran aufgelegt wurden. Den Abschluß bildete wieder eine Schicht Whatman-Papier. Da die Proteine durch die SDS-PAGE negativ geladen sind, wandern sie in Richtung Pluspol und bleiben dabei in der Membran hängen.

**4.2 Southernblot**

Mit Hilfe dieser Technik kann man DNA-Fragmente auf Nylon- oder Nitrocellulosemembranen übertragen und detektieren. Dazu wurde zuerst eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe B.9.6.1) und danach das Gel in eine Denaturierungslösung gelegt, anschließend neutralisiert und in 2 x SSC equilibriert (Lösungen siehe B 12.2). Der Aufbau eines Southernblots ist in Abb. 12. dargestellt. Die Gele wurden über Nacht durch Kapillarkräfte auf eine Membran transferiert und die DNA durch Inkubation bei 80°C auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung und Detektion erfolgte wie in Abschnitt B 12.2 (Sondenscreening) beschrieben.

Als Transferpuffer wurde 20 x SSC verwendet.



**Abb. 12: Aufbau eines Southern/Northernblots**

Die DNA/RNA wird bei diesem Blot durch Kapillarkräfte auf die Membran gezogen. Dazu wurde das blottende Gel auf ein Whatman-Papier gelegt, das mit beiden Enden in den Transferpuffer (20 x SSC) hineinreicht. Auf das Gel wurde luftblasenfrei eine Nylonmembran gelegt und darauf Schichten von Whatman-Papier und weichen Papiertüchern. Den Abschluß bildete ein Gewicht. Es wurde in der Regel über Nacht geblottet.

### 4.3 Northern Blot (Alwin *et al.*, 1977)

Entsprechend des Southern Blots kann man mit einem Northern Blot spezifische RNA in einem Gemisch verschiedener RNAs zu detektieren. Die Gele mussten jedoch vor dem Blotten in 2 x SSC equilibriert werden, um das im Gel enthaltene Formaldehyd zu entfernen (RNA-Gelelektrophorese siehe B 9.6.2). Nach dem Transfer über Nacht auf eine Nylon – oder Nitrocellulosemembran wurde die RNA durch Inkubation bei 80°C fixiert und danach mit einer entsprechenden Sonde detektiert (siehe Abb. 12).



## 5. Sauerstoffbindungskinetik

Die Versuche zur Sauerstoffbindungskinetik wurden im Institut für Molekulare Biophysik bei Herrn Prof. Decker durchgeführt.

Dabei kann man das Fluoreszenzsignal des Proteins als Marker für die Sauerstoffbeladung nutzen, da Tryptophanreste des Hämocyanins während dieses Beladungsvorgangs bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm fluoreszieren. Während der Beladung des Hämocyanins mit Sauerstoff sinkt das Fluoreszenzsignal dementsprechend kontinuierlich ab. Die Sauerstoffbindung wurde nach der Methode von Loewe (1978) gemessen, bei der die Hämocyaninlösung nach der Oxygenierung wieder vollständig deoxygeniert wird und dabei der Sauerstoffpartialdruck und die Beladung des Hämocyanins mit Sauerstoff gemessen wird. Gemessen wurde mit einer Elektrode, die aus einer Arbeitselektrode (Platinkathode) und einer Gegenelektrode (Silberanode) bestand. Diese wurde in eine 1 cm<sup>2</sup>-Quarzküvette eingesetzt, in der sich etwa 600 µl der zu messenden Probe befanden. Zu Beginn einer Messung wurde die Küvette mit 100 % Sauerstoff begast, so dass sich ein stabiles Signal einstellt. Dann wurde zur Deoxygenierung 100 % Stickstoff eingeleitet. War der Deoxy-Zustand erreicht, wurde die Küvette mit 5 % Sauerstoff begast, um zum relativen Maximum und dem Nullpunkt noch einen weiteren Fixpunkt zu erhalten. Eine Sauerstoffbindungskurve erhält man über eine Digitalisierung der Messwerte. Aus der Kurve konnte man den P<sub>50</sub>-Wert, also den Wert, bei dem das Protein zu 50 % mit Sauerstoff gesättigt ist, ablesen. Der Hill-Koeffizient wurde graphisch aus der Steigung der Kurve am Halbsättigungspunkt im Hill-Diagramm ermittelt.

## 6. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Hämocyanin-Moleküle wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Zeiss EM 420 durchgeführt. Als Objektträger fungierten sogenannte Grids, runde Netzchen aus Kupfer, die mit Kohlenstoff bedampft und vor der Verwendung beglimmt werden. Es wurden etwa 2 µl Hämolymphe in einer Konzentration von etwa 0,1 mg/ml aufgetragen. Anschließend wurden die Grids nacheinander durch drei Tropfen H<sub>2</sub>O gezogen, um sie zu waschen. Eine negative Kontrastierung kann entweder mit Uranylacetat oder Ammoniummolybdat durchgeführt werden.

## 7. Test auf Phenoloxidaseaktivität

Um auszuschließen, dass es sich bei den identifizierten Hämocyaninen um die sehr ähnlichen Phenoloxidasen handelt, kann man einen Test auf Phenoloxidaseaktivität durchführen. Dabei wird untersucht, ob ein Protein in der Hämolymphe Thyramin (Monophenoloxidaseaktivität), bzw. Dopamin (Diphenoloxidaseaktivität) umsetzt. Dazu wurde Hämolymphe in einer nativen PAGE aufgetrennt und die Enzyme zugegeben. Im Falle einer Aktivität ist eine Farbreaktion sichtbar (Decker *et al.*, 2001).

## 8. Mikrobiologische Methoden

### 8.1 Bakterienstämme und Vektoren

Folgende Bakterienstämme der Art *Escherichia coli*, bei denen es sich um Derivate des Stammes K12 handelt und die durch Modifikationen nicht mehr humanpathogen sind, wurden verwendet :

#### **Bakterienstämme :**

- *E. coli* XL 1 Blue MRF´ (Stratagene, Heidelberg)
- *E. coli* XL0LR (Stratagene, Heidelberg )
- *E. coli* Top10 (Invitrogen, Groningen)

#### **Phagen :**

Zur Synthese aller cDNA-Banken wurden der ZAP Express Vektor und für die *in vivo*-Excision (siehe Abschnitt B.12.3) der ExAssist™ Helfer-Phage (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

## Plasmidvektoren :

Folgende Plasmidvektoren wurden verwendet :

pBK-CMV (Stratagene, Heidelberg)	ZAP Express™ cDNA-Banken
pGEM-T (Promega, Mannheim)	Klonierung von PCR-Fragmenten
pGEM-T easy (Promega, Mannheim)	Klonierung von PCR-Fragmenten
PCR II TOPO TA (Invitrogen, Groningen)	Klonierung von PCR-Fragmenten
PCR II TOPO XL (Invitrogen, Groningen)	Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Vektorkarte des pBk-CMV-Vektors ist in Abbildung 14 gezeigt.

## 8.2 Nährmedien und Agarplatten

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

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

Um ein selektives Wachstum von bestimmten Bakterien zu ermöglichen, wurden Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen mit Antibiotika versetzt.

Folgende Konzentrationen von Antibiotika wurden verwendet :

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

Um eine Blau-Weiß-Selektion der Bakterien durchzuführen ( $\alpha$ -Komplementation, Langley *et al.* 1975) wird LB-Agar mit IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Galactosid) und X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid) versetzt, autoklaviert und mit einem entsprechendem Antibiotikum in Petrischalen gegossen.

### 8.3 Glycerinkulturen

Zur längeren Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angesetzt und bei -80°C eingefroren. Dazu wurden aus frischen Flüssigkulturen 500  $\mu$ l mit einem gleichen Volumen sterilem Glycerin vermischt. Solche Glycerinkulturen sind in der Regel für mehrere Monate bei -80°C haltbar.

### 8.4 Plattenkulturen

Aus Glycerinkulturen der Bakterien wurden Ausstriche auf Agarplatten hergestellt, die mit entsprechenden Antibiotika versetzt sind. Dazu wurden die Bakterien entweder mit einer sterilen Platinöse oder mit einem autoklavierten Zahnstocher auf dem Agar verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend konnten diese Platten für einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

### 8.5 Flüssigkulturen

Um Bakterien zu kultivieren wurden Einzelkolonien von einer Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher in ca. 4 ml LB-Medium, das wiederum mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt ist, überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

## 8.6 Herstellung kompetenter Bakterien

Um definierte Plasmide vervielfältigen zu können, müssen sie zuvor in Bakterien transformiert werden. Falls nicht die bei einigen Klonierungsvektoren mitgelieferten kompetenten Bakterien verwendet wurden (z. B. bei Invitrogen, PCR II TOPO TA und PCR II TOPO XL), konnte man XL1-Blue Bakterien nach einer modifizierten  $\text{CaCl}_2$ -Methode (Cohen *et al.*, 1972) kompetent machen. Dazu wurden die Bakterien einer Flüssigkultur (siehe B 5.5) im Verhältnis 1:100 in frischem Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis sie eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 bis 0,4 erreicht hatten. Die sich dabei in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Bakterien wurden pelletiert (5 min, 500xg, 4°C), in 10 ml eiskaltem  $\text{MgCl}_2$  (0,1M) resuspendiert, erneut pelletiert und anschließend in 2 ml eiskaltem  $\text{CaCl}_2$  (0,1M) resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden dann für mindestens für 30 min auf Eis gehalten und konnten anschließend direkt für die Transformation verwendet werden.

## 8.7 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden 100  $\mu\text{l}$  kompetente Bakterien mit den zu transformierenden Plasmiden (etwa 10 bis 100 ng zirkuläre Plasmid-DNA) gemischt und für mindestens 45 min. auf Eis gehalten. Nach kurzem Hitzeschock (45 bis 60 sec, 42 bis 45°C) wurde dem Ansatz 900 $\mu\text{l}$  LB-Medium zugegeben und die Bakterien bei 37°C zur Erholung mindestens 1,5 Std. inkubiert. Danach konnten die transformierten Bakterien auf LB-Platten ausplattiert werden, die zur Selektion plasmidtragender Klone mit entsprechenden Antibiotika versetzt worden waren.

## 9. Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 9.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren zu präzipitieren, wurde die Probe mit einem zehntel Volumen einer Lösung einwertiger Kationen (10M Ammoniumacetat, 8M Lithiumchlorid, 2M Natriumchlorid oder 3M Natriumacetat) und 2,5 Volumen Ethanol p.a. oder 0,7 Volumen Isopropanol p.a. gemischt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  60 min. oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Anschließend wurde das gewonnene Präzipitat bei 12 000xg für 60 min zentrifugiert.

Das Pellet wurde dann mit 70% Ethanol gewaschen, erneut für 5 min zentrifugiert und bei Raumtemperatur oder in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die gefällten Nukleinsäuren konnten dann in  $\text{H}_2\text{O}$  oder einem entsprechenden Puffer gelöst werden.

### 9.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für eine Bestimmung der Ausbeute an RNA, bzw. DNA nach einer Gelextraktion oder einer RNA-Präparation, hat man die Möglichkeit eine photooptische Messung durchzuführen, die eine Aussage über die Konzentration der Nukleinsäurelösung zulässt. Nukleinsäuren haben eine Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Messungen wurden mit Küvetten einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt.

Für die Konzentrationsbestimmung gilt :

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

$$1\text{OD}_{260} \approx 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$$

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

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

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

Alternativ konnte der sogenannte „Dot“-Test durchgeführt werden, bei dem 0.5 bis 1 µl DNA auf eine 1% Agaroseplatte, die mit Ethidiumbromid versetzt ist, aufgetragen wurde und die DNA-Menge durch Vergleich mit einem bekannten Standard abgeschätzt werden konnte.

### **9.3 Präparation von Plasmid-DNA**

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

- QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden)
- E.Z.N.A Miniprep Kit der Firma Peqlab (Erlangen)

### **9.4 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen**

Um Plasmid-DNA zu verdauen, wurden Restriktionsenzyme verwendet. Diese Endonukleasen des Typs II sind Enzyme, die Phosphodiesterbindungen von DNA-Molekülen an spezifischen Stellen schneiden können. Diese Schnittstellen sind palindromische Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaare Länge, deren Temperaturoptimum meist bei 37°C liegt. Die Restriktionsendonukleasen wurden von verschiedenen Firmen bezogen.

#### **Standard-Restriktionsansatz :**

200 ng bis 1 µg Plasmid DNA

1 bis 5 Einheiten (units) Enzym (1 unit schneidet 1 µg DNA/h unter optimalen Bedingungen)

Reaktionspuffer

mit H<sub>2</sub>O auf 20 µl auffüllen

## 9.5 Sondenherstellung

### 9.5.1 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Durch eine Digoxigeninmarkierung konnten DNA-Fragmente als Sonde für Southernblots, sowie für das Screening einer cDNA-Bank nutzbar gemacht werden. Für diese Markierung wurde das Dig High Prime Kit der Firma Boehringer (Mannheim) verwendet. Diese Markierungsmethode beruht auf der Anlagerung von hexameren random-Nukleotiden, an die zu markierenden Fragmente. Diese Oligonukleotide dienen dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I als Primer zur Synthese des komplementären Stranges. Der verwendete Nukleotidmix enthielt neben den vier Nukleotidtriphosphaten (dTTP, dATP, dGTP, dCTP) auch noch ein mit Digoxigenin modifiziertes dUTP. Das Verhältnis zwischen dTTP und Dig-dUTP war so gewählt, dass statistisch jedes 20. bis 25. Nukleotid des neu synthetisierten Stranges mit Digoxigenin markiert ist. Detektiert wurden diese Fragmente mit alkalischer-Phosphatase-konjugierten Fab-Fragmenten und einer Nachweisreaktion mit NBT und BCIP (siehe B.12.1).

Markiert wurden Fragmente, die als Plasmide vorlagen und die aus cDNA-Banken isoliert wurden. Über einen Restriktionsverdau konnten die gewünschten Fragmente aus den Vektoren herausgeschnitten, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend daraus extrahiert werden.

Pro Markierungsreaktion wurden bis zu 1 µg DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge eingesetzt. Die Reaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Alternativ kann man Dig-markierte Fragmente auch über eine PCR mit Dig-markierten dNTPs herstellen. Dazu wurde ein Fragment mit spezifischen oder degenerierten Primern amplifiziert und anstelle von Standard Nukleotiden ein Nukleotidmix verwendet, der Dig-markierte dUTPs enthielt.



### 9.5.2 *in vitro* Transkription

Um eine RNA-Sonde für einen Northern Blot herzustellen, kann man eine *in-vitro* Transkription mit einer DNA-Matrize durchführen (Abb. 13). Man erhält diese sogenannten run-off Transkripte durch eine Amplifikation von Sequenzen, die in Vektoren kloniert sind, die Promotoren von Bakteriophagen (SP6, T3, T7) enthalten. Diese Promotorsequenzen liegen unmittelbar vor oder hinter der *multiple cloning site*. Dazu wurde DNA, die in ein solches Plasmid einkloniert vorliegt, linearisiert und amplifiziert. Während der Transkription wurden mit Dig-markierte Ribonukleotide zugegeben, so dass (wie im Fall der PCR-Sonden) die entstehenden RNA-Sonden direkt während der Transkription markiert wurden.

#### Standard-Ansatz (Boehringer Kit)

1-5 µg	Template DNA (linearisiert)
ad 7 µl	mit RNase-freiem H <sub>2</sub> O
2 µl	10 x Puffer
2 µl	Dig UTP/NTP-Mix
1 µl	RNasin
2 µl	T7-Polymerase

Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 2µl 0.2 mM EDTA oder durch Erhitzen auf 65°C gestoppt. Als RNA-Sonde konnten direkt 5 µl dieses Ansatzes eingesetzt werden.

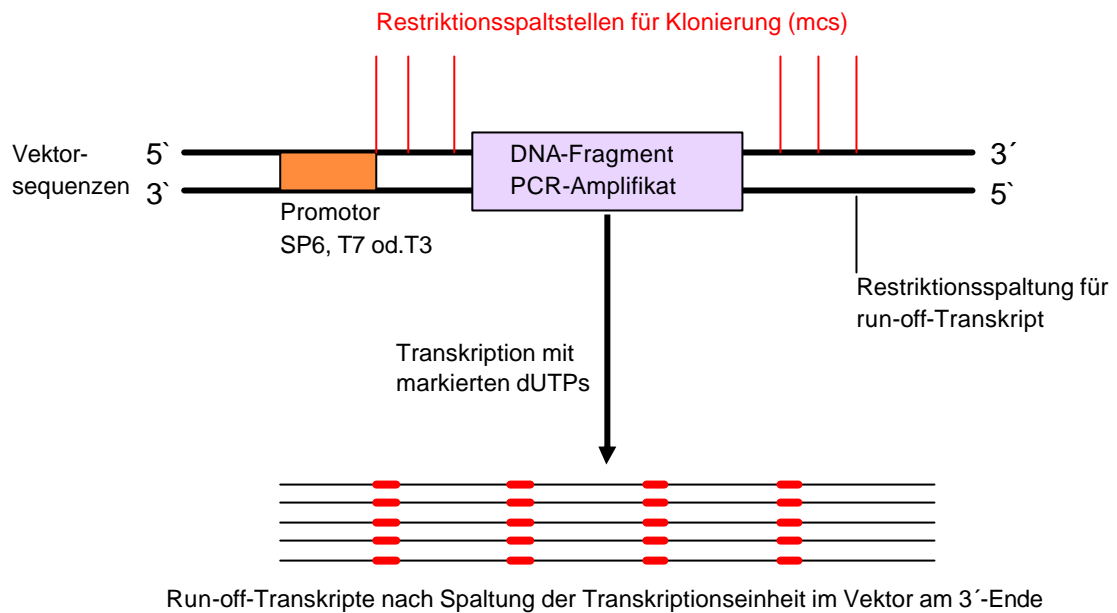


Abb. 13: Schema der *in vitro* Transkription

## 9.6 Gelelektrophorese

### 9.6.1 DNA-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragment entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, wurden sie in einem 0,5 bis 2%-igen, mit Ethidiumbromid versetzten horizontalem Agarosegel bei einer Spannung von 6V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Als Elektrophorespuffer diente 0,5 x TBE.

Ethidiumbromid ist ein bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoreszierendes Molekül, das in die DNA interkaliert und auf diese Art sichtbar macht. Dementsprechend handelt es sich dabei um eine stark cancerogene Chemikalie.

Als Molekulargewichtsstandard wurde mit EcoRI und HindIII geschnittene  $\lambda$ -Phagen-DNA aufgetragen.

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

### 9.6.2 RNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in 1% Agarosegelen, die mit Formaldehyd als denaturierendes Agens versetzt wurden, das gleichzeitig die Aktivität von RNasen während der Elektrophorese verhinderte.

#### Ansatz für ein horizontales Minigel :

0,4 g Agarose  
4 ml 10 x MOPS-Puffer  
30 ml H<sub>2</sub>O  
aufkochen und abkühlen auf ca. 50°C  
6,8 ml Formaldehyd

**10 x MOPS-Puffer**                    0.2 M MOPS, pH 7  
    0.05 M NaAcetat, pH 7  
    0.1 M EDTA, pH 8

**10 x Beladungspuffer**                50% Glycerin  
    0.4 % Bromphenolblau  
    0.4% Xylencyanol  
    10 x TBE

Die RNA-Proben wurden in einem Volumen von 4.5 µl mit 10 µl Formamid, 2µl 10 x MOPS-Puffer und 3.5 µl Formaldehyd bei 70°C für 5 min. denaturiert und mit 0.1 Volumen 10 x Beladungspuffer versetzt aufgetragen. Zur Sichtbarmachung unter UV-Licht der RNA wurde der Probe ebenfalls Ethidiumbromid zugesetzt.

## 9.7 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde mit Systemen verschiedener Hersteller durchgeführt, die alle auf dem Prinzip der reversiblen Bindung der DNA an eine Silicamatrix beruhen. Nach der Bindung und Reinigung ließ sich die DNA unter leicht alkalischen Bedingungen ( $\geq$  pH 8) wieder aus der Membran eluieren.

Folgendes Kit wurde verwendet :

- Qiagen Gelextraction

Die Extraktion erfolgte auch hier nach Angaben des jeweiligen Herstellers. Es konnte jedoch eine Modifikation der Elutions-Bedingungen durchgeführt werden, um die Ausbeute zu erhöhen. Dazu wurde in einem Volumen von 100  $\mu$ l eluiert das danach mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge wieder auf ein geringes Volumen eingeengt wurde. Auch hier konnte man die Ausbeute an DNA photooptisch bestimmen.

## 10. Präparation von Gesamt-RNA

Je nach Tier wurden unterschiedliche Gewebe zur RNA-Präparation verwendet. Bei den Crustaceen *Homarus americanus* und *Palinurus elephas* wurden hauptsächlich Mitteldarmdrüse, Ovarien, Herz, Darm, Bindegewebe und Muskulatur präpariert. Bei den Diplopoden *Spirostreptus spec.* wurden alle Organe sowie der Kopf verwendet. Bei *Scutigera coleoptrata* und den *Epiperipatus spec.* wurde aufgrund der geringen Größe eine Präparation des gesamten Tieres durchgeführt.

Zuerst wurden die Tiere auf Eis 1 bis 2 h zur Immobilisierung gekühlt. Die Crustaceen wurden zusätzlich mit Chlorophorm narkotisiert. Alle Tiere wurden durch Dekapitation devitalisiert. Während der ganzen Präparation wurde auf Eis gearbeitet und zusätzlich Vorsichtsmaßnahmen getroffen, die die RNA vor Degradation durch RNasen schützen sollten :

- das verwendete Präparationsbesteck wurde durch Autoklavieren sterilisiert
- es wurde ausschließlich mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltes H<sub>2</sub>O verwendet
- alle Eppendorf und Falcon-Gefäße waren steril und autoklaviert

Um die Qualität der RNA zu testen, wurde zusätzlich eine Formaldehyd-RNA-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe B.9.6.2).

### **10.1 RNeasy Maxiprep Kit der Firma Qiagen GmbH (Hilden)**

Bei dieser Präparationsmethode wurde nach Versuchsanleitung des Herstellers das Gewebe in einem denaturierenden Puffer mit GTC (Guanidinthiocyanat) und  $\beta$ -Mercaptoethanol homogenisiert und lysiert, um die Aktivität von RNasen während der Präparation zu unterbinden. Hierzu wurde, wie auch bei anderen Präparationsmethoden, ein mit Isopropanol gereinigter Mörser mit Pistill verwendet. Die Aufreinigung der RNA erfolgte über eine Säule mit einer Silica-Matrix, die unter geeigneten Bedingungen spezifisch RNA bindet. Die gesamte Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### **10.2 RNA-Präparation nach GTC-Methode**

Um größere Mengen an Gewebe zu präparieren oder um eine Verstopfung der Silica-Matrix in der Säule durch die Proteine des Arthropoden Exoskeletts zu umgehen, wurde RNA nach einer alternativen Methode gewonnen. Dazu wurde das Gewebe ebenfalls mit Mörser und Pistill unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff homogenisiert und direkt in 10 bis 20 ml GTC-Puffer überführt. Dann wurden nacheinander 1 ml 2M Natriumacetat, 10 ml Phenol und 10 ml CIA (Chloroform-Isoamylalkohol 49:1) zugegeben und 15 min. auf Eis gekühlt. Die Probe wurde dann 30 min. bei 10 000 rpm und 4°C zentrifugiert und danach die wässrige Phase mit 1 Volumen Isopropanol gemischt. Es folgte eine Präzipitation bei -20°C für mindestens 1 h. Anschließend wurde unter den gleichen Bedingungen ein weiteres mal zentrifugiert und das Pellet in etwa 10 ml GTC-Puffer gelöst. Die Präzipitation mit 1 Volumen mit 1 Volumen Isopropanol wurde wiederholt und nach einer Zentrifugation das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen. Das Pellet mußte bei Raumtemperatur völlig trocknen und konnte dann in 5 bis 10 ml H<sub>2</sub>O bidest gelöst werden (eventuell 20-30 min. schütteln bei 55-58°C). Die Lösung wurde durch Zentrifugation erneut pelletiert. Die RNA befand sich danach im Überstand. Auch hier wurde die Menge und Reinheit der RNA durch Photometrie bestimmt sowie die Qualität durch eine Formaldehyd-Gelelektrophorese abgeschätzt.

**Lösungen :**

- GTC-Puffer :            100 g Guanidinthiocyanat in 117 ml H<sub>2</sub>O bidest lösen  
                              7.0 ml 0.75M Natriumcitrat, pH 7.0  
                              10.6 ml 10% Sarcosyl  
                              1.52 ml β-Mercaptoethanol
- 2M Natriumacetat, pH 4.0
- wässrige Phenollösung
- Chlorophorm-Isoamylalkohol 49:1
- Isopropanol p.a.
- 80% Ethanol
- H<sub>2</sub>O bidest (mit DEPC behandelt)

**10.3 Präparation von poly-A<sup>+</sup>-RNA mit PolyATract mRNA Isolation System I (large scale) und IV (small scale) der Firma Promega (Mannheim)**

Dieser Methode liegt zugrunde, dass die meisten eukaryotischen mRNA-Moleküle im Gegensatz zu den anderen vorhandenen RNAs (z.B. tRNA, rRNA, snRNA) an ihrem 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal tragen, das aus bis zu 250 Adenosin-Nukleotiden besteht. Mit Hilfe dieses poly-A<sup>+</sup>-Schwanzes lässt sich mRNA von allen anderen RNAs trennen, die einen Anteil von etwa 5% an der Gesamt-RNA hat.

Die PolyATract-Präparationsmethode verwendet ein oligo(dT) Oligonukleotid, das an seinem 5'-Ende biotinyliert ist. Dieses Biotin-oligo(dT) Oligonukleotid hybridisiert mit dem poly-A<sup>+</sup>-Schwanz der mRNA spezifisch. Mit Hilfe von Streptavidin (Streptavidin-PMP, paramagnetic particles), das an magnetische Partikel gebunden ist und ganz spezifisch an Biotin bindet, lassen sich die poly-A<sup>+</sup>-RNA-Biotin-oligo(dT)-Moleküle in einem magnetische Feld von anderen RNAs trennen und aufreinigen. Auch hier wurde exakt nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

## 11. Synthese von cDNA-Banken

Komplementäre DNA(cDNA)-Banken repräsentieren die Information der messenger RNA (mRNA) bestimmter Organismen, bzw. Geweben. Dabei wird die sehr labile RNA in cDNA umgeschrieben und dann in einen selbstreplizierenden  $\lambda$ -Vektor kloniert. Diese cDNA-Expressionsbanken können dann mit Hilfe von Antikörpern oder spezifischen Sonden auf bestimmte genetische Informationen durchsucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere cDNA-Banken unterschiedlicher Organismen angefertigt (siehe B 11.6). Alle cDNA-Banken wurden mit dem ZAP Express™ cDNA Synthese Kit der Firma Stratagene (Heidelberg) hergestellt. Dabei wurde die cDNA gerichtet in die Vektorarme kloniert, mit Hilfe des Induktors IPTG die Expression des in der Bank kodierten Proteins induziert und mit der sogenannten *in vivo*-Excision in ein Plasmid überführt.

### 11.1 Erststrangsynthese

Im ersten Schritt wurden mittels der reversen Transkriptase bis zu 5  $\mu$ g poly-A<sup>+</sup>-RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Zu diesem Zweck mußten die Sekundärstrukturen der RNA bei 70°C denaturiert werden. Außerdem mußte bei allen Arbeiten mit RNA darauf geachtet werden, dass sie nicht von RNasen angegriffen und zerstört werden, weshalb mit RNase-freien Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen gearbeitet wurde. Die Synthese der cDNA-Bank erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Erststrangsynthese wurde ein Linkerprimer eingesetzt, der an seinem 5'-Ende zum einen die zum poly-A<sup>+</sup>-Schwanz komplementäre oligo(dT)-Sequenz und zusätzlich die Schnittstelle für das Restriktionsenzym Xho I besitzt. Dadurch wurde ein gerichtetes Klonieren in die ZAP Express-Vektorarme respektive des *lacZ* Promotors ermöglicht. Durch den Einsatz methylierter Nukleotide besitzt die Erststrang-cDNA eine Methylgruppe an jedem Cytosin, die einen unerwünschten Verdau an anderen Xho I-Schnittstellen verhindert. Als reverse Transkriptase wurde die MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase) verwendet.

## 11.2 Zweitstrangsynthese

Die Zweitstrangsynthese erfolgte durch das Enzym Polymerase I, das für seine Reaktion einen Primer benötigt, an denen der zweite Strang komplementär zum ersten cDNA-Strang synthetisiert wird. Dazu dienten hier die RNA-Reste, die nach Behandlung der RNA-DNA-Hybride mit dem Enzym RNase H erhalten geblieben sind. Dadurch entstand doppelsträngige cDNA, bei der nicht-methyliertes dCTP eingebaut wurde, um einen späteren Restriktionsverdau der cDNA mit XhoI zu ermöglichen. Danach wurden die Enden der cDNA-Moleküle mit Hilfe der *pfu* DNA Polymerase aufgefüllt (bunt) und nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion an EcoRI-Adaptoren ligiert. Nach einer Phosphorylierung und einem Restriktionsverdau mit XhoI besitzen die cDNA-Moleküle an beiden Seiten cohesive Enden, die dann gerichtet in die Vektorarme kloniert werden konnten.

## 11.3 Größenfraktionierung

Um die cDNA-Moleküle ihrer Größe nach zu selektionieren wurde eine Größenfraktionierung mit einer Sephacryl S 500-Säule durchgeführt. Dabei wurde die cDNA auf eine Matrix aufgebracht und bei 400 x g zentrifugiert. Große Fragmente liefen dabei schneller durch die Säule als kleine. Die Fraktionen wurden gesammelt und eine Phenol/Chloroform-Extraktion, sowie eine Fällung durchgeführt. Die Fraktion, die die größten Fragmente enthielt, wurde weiterverarbeitet.

## 11.4 Ligation in die Vektorarme und Verpackung

Es wurden bis zu 500 ng cDNA über Nacht in die Vektorarme ligiert.

Für die Verpackung wurden 1 bis 4 µl dieses Ligationsansatzes mit dem Verpackungskit Gigapack III Gold der Firma Stratagene (Heidelberg) für genau 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hier wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

Nach dieser Prozedur hatte man eine „primäre cDNA-Bank“, deren Titer in einer Verdünnungsreihe bestimmt wurde. Dazu wurden die Phagen in SM-Puffer verdünnt und mit Bakterien des *E. coli*-Stammes XL-1 Blue MRF' bei 37°C für 30 min. inkubiert. Danach wurden sie mit NZY-Topagar auf NZY-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 6 bis 8 Std. waren die Phagen als Plaques im Bakterienrasen sichtbar und konnten ausgezählt werden. Dazu wurden die Plaques gezählt, die als Löcher im Bakterienrasen sichtbar waren. Die Einheit dafür sind die pfu = plaque forming units.



Der Primärtiter schwankte bei den im Rahmen dieser Arbeit erstellten cDNA-Banken zwischen 500 000 und 7 000 000 pfu/ml.

- SM-Puffer**
- 0,1 M NaCl
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub> x 7 H<sub>2</sub>O
  - 50 mM Tris/Hcl
  - 0,01% (w/v) Gelatine
  - pH 7,5

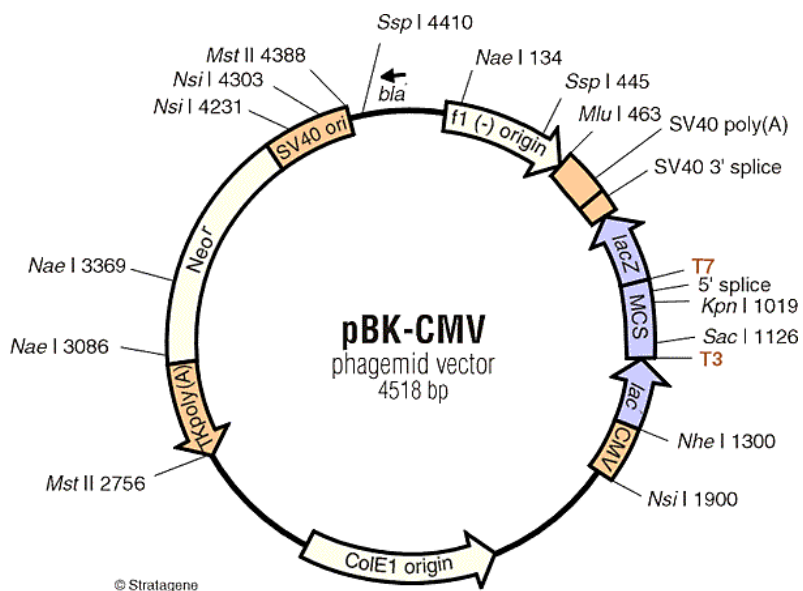


Abb. 14: Vektorkarte des pBK-CMV-Vektors :

## 11.5 Amplifikation der cDNA-Bank

Die gesamte Primärbank wurde auf NZY-Agarplatten mit ca. 50 000 pfu pro Platte ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und die Phagen mit SM-Puffer eluiert. Auch hier wurde der Titer der amplifizierten Bank in einer Verdünnungsreihe ermittelt.

## 11.6 Liste der erstellten cDNA-Banken

Organismus	Gewebe	Vektor
<i>Spirostreptus spec.</i>	innere Organe und Kopf	ZAP Express™
<i>Scutigera coleoptrata</i>	vollständige Tiere	ZAP Express™
<i>Palinurus elephas</i>	Mitteldarmdrüse	ZAP Express™
<i>Homarus americanus</i>	Mitteldarmdrüse	ZAP Express™
<i>Epiperipatus spec.</i>	vollständige Tiere	ZAP Express™

## 12. Screening von cDNA-Banken

### 12.1 Antikörperscreening

Der ZAP Express™-Vektor ist ein Expressionsvektor mit dem die in die Vektorarme ligierte cDNA problemlos in XL-1 Blue Bakterien exprimiert werden kann. Die Expression kann durch Zugabe eines  $\beta$ -Galaktosids induziert werden, da vor der Klonierungsstelle des Vektors der *lacZ*-Promotor lokalisiert ist. Bei der Synthese der cDNA-Bank werden durch die Reverse Transkriptase unterschiedlich lange Transkripte hergestellt. Zum Screening standen mir verschiedene Antikörper gegen verschiedene Crustaceen- und Cheliceratenhämocyanine aus den siebziger und achtziger Jahren von Prof. Markl zur Auswahl, mehrere Antikörper gegen *Palinurus* Hämocyanin, die uns freundlicherweise von J. Beintema zur Verfügung gestellt wurden, außerdem wurden weitere Antikörper gegen *Spirostreptus*- und *Scutigera*-Hämocyanin hergestellt.

Das Antikörperscreening stellt eine abgewandelte Methode der Immunoscreening-Methode nach Sambrook *et al.* (1989) dar. Dazu wurden ca. 50 000 pfu der cDNA-

Bank mit NZY-Topagar auf NZY-Agarplatten ausplattiert und 5 bis 6 Std. bei 42°C inkubiert. Wenn nach dieser Zeit die ersten Plaques im Bakterienrasen sichtbar waren, wurden mit 10 mM IPTG getränkte Nitrocellulosemembranen aufgelegt und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Filter wurden dann markiert, von den Platten abgezogen und kurz in 1 x TBST gewaschen, um Bakterienreste zu entfernen. Danach wurden sie in 5% Trockenmilchpulver/TBST abgesättigt, um unspezifische Bindungen zu verhindern und anschließend mit dem entsprechenden Antikörper in 5% Milch/TBST über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Antikörper und die verwendeten Verdünnungen sind unter B.12.1.1 aufgelistet. Der primäre Antikörper wurde 3x10 min mit TBST gewaschen und 1 Std. bei Raumtemperatur mit einem entsprechenden sekundären Antikörper (1:10000) inkubiert. Nach erneuten Waschschritten (3x10 min.) konnten die positiven Klone mit einer Farbreaktion detektiert werden. Die anti-Hämocyanin-Antikörper wurden in Kaninchen oder Meerschweinchen hergestellt und konnten deshalb von entsprechenden in Ziegen hergestellten Sekundärantikörpern anti-Kaninchen oder anti-Meerschweinchen erkannt werden. Da diese sekundären Antikörper mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt vorlagen, konnte man sie mit Entwicklungspuffer, der mit NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) versetzt wurde, nachweisen. Für 10 ml Entwicklungspuffer wurden 33 µl BCIP- und 66 µl NBT-Stammlösung verwendet. Die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase erfolgt durch eine Umsetzung des Substrates BCIP zu einem unlöslichen blauen Farbstoffes unter Anwesenheit des Katalysators NBT. Die Farbreaktion kann durch Zugabe von H<sub>2</sub>O dest. gestoppt werden. Die positiven Klone wurden aus dem Agar ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer mit 20 µl Chloroform bei 4°C aufbewahrt. Das Screening wurde solange wiederholt, bis es möglich war, Einzelplaques zu isolieren.

**10 x TBS**

100 mM Tris/HCl  
1.5 M NaCl  
pH 7.5

**1 x TBST (1000 ml)**

100 ml 10 x TBS  
3 ml Tween  
auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O dest. Auffüllen

---

<b>Entwicklungspuffer</b>	100 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 5 mM MgCl pH 9.5
<b>NBT-Stammlösung</b>	50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid
<b>BCIP-Stammlösung</b>	50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid

### 12.1.1 Verwendete Antiseren :

Antigen	Bezeichnung des Antikörpers	Zweitantikörper	Verdünnungen für Westernblot	Verdünnungen für Screening
1. Hummer-Hämocyanin	$\alpha$ -Homarus americanus, 1979	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 20 000	1 : 2000
2. Hummer-Hämocyanin	$\alpha$ -Hom denaturiert (UE C)	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 20 000	1 : 2000
3. Hummer-Hämocyanin	$\alpha$ -Homarus b	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 20 000	1 : 2000
4. Hummer-Hämocyanin	$\alpha$ -Hom, 29.12.1981	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 20 000	1 : 2000
5. Hummer-Hämocyanin	$\alpha$ -Homarus gesamt, 1.83	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 20 000	1 : 2000
6. Hummer-Hämocyanin	$\alpha$ -Hom $\delta$ , 22.12.81	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 20 000	1 : 2000
7. Flußkrebs-Hämocyanin	$\alpha$ -Astacus 1	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 1000 *	nicht durchgeführt
8. Flußkrebs-Hämocyanin	$\alpha$ -Astacus $\alpha$ (UE 3/4)	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 1000 *	nicht durchgeführt
9. Flußkrebs-Hämocyanin	$\alpha$ -Astacus $\delta$ (UE 2)	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 1000 *	nicht durchgeführt
10. Languste-Hämocyanin	$\alpha$ -94 I	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 50 000	1 : 5000
11. Languste-Hämocyanin	$\alpha$ -94 II	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 50 000	1 : 5000

12. Languste-Hämocyanin	$\alpha$ -90 I	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 50 000	1 : 5000
13. Languste-Hämocyanin	$\alpha$ -90 II	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 50 000	1 : 5000
14. Tausendfüßer-Hämocyanin	$\alpha$ -Spirostreptus	$\alpha$ -Meerschweinchen	1 : 200 000 bis 1 : 1 000 000	1 : 20 000
15. Spinnenläufer-Hämocyanin	$\alpha$ -Scutigera	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 10 000 bis 1 : 20 000	1 : 2000
16. Vogelspinne-Hämocyanin	$\alpha$ -Eurypelma SDS denaturiert	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 2000 *	nicht durchgeführt
17. Vogelspinne-Hämocyanin	$\alpha$ -Eurypelma nativ	$\alpha$ -Kaninchen	1 : 2000 *	nicht durchgeführt

\* bei heterologer Anwendung

1-9, sowie 15 und 16 waren in der Arbeitsgruppe vorhanden, 10-13 wurden von J. Beitema zur Verfügung gestellt. Die Antiseren 14 und 15 wurden von der Fa. Charles River (Kißlegg) kommerziell hergestellt.

## 12.2 Sondenscreening

Mit Hilfe von DNA-Sonden hat man die Möglichkeit, Klone aus cDNA-Banken zu isolieren, die sich für eine Detektion mit Antikörpern als ungünstig erweisen oder im falschen Leseraster liegen. Allerdings sind für die Herstellung einer DNA-Sonde Information über die Sequenz notwendig. Aus diesem Grund ist das Sondenscreening eine wirkungsvolle Methode bestimmte Klone zu finden, von denen schon durch Methoden wie Antikörperscreening oder PCR-Techniken Teilsequenzen bekannt sind. Zur Herstellung von DNA-Sonden siehe B.9.5.

Für das Sondenscreening wurden cDNA-Banken wie beim Antikörperscreening auf NZY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden für 30 bis 60 min bei 4°C abgekühlt, danach wurde eine Nylonmembran für ca. 60 sec aufgelegt, um die Phagen-DNA zu transferieren. Danach wurden die Nylonfilter mit der Plaquesseite nach oben für 10 min auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Whatman-Papier gelegt, um die doppelsträngige DNA zu denaturieren. In zwei folgenden Schritten wurden die Filter auf die gleiche Weise zuerst neutralisiert und equilibriert. Nach kurzem Antrocknen wurde die DNA durch eine Inkubation bei 80°C auf der Membran fixiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden zunächst durch 60 min Inkubation in der Hybridisierungslösung bei 68°C abgesättigt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C in 30 ml Hybridisierungslösung. Es wurden etwa 5 ng Dig-Sonde eingesetzt. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zuerst bei Raumtemperatur 2 x 15 min mit 2 x Waschpuffer und dann für 30 bis 60 min mit 0,5 x Waschpuffer bei 68°C gewaschen. Die Filter wurden für 60 min mit Blockierungspuffer und anschließend mit dem sekundären anti-Fab-Fragment, das ebenfalls mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt vorliegt, inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Filter mit TBST-Puffer gewaschen und die Farbnachweisreaktion mit NBT/BCIP durchgeführt werden. Die positiven Klone wurden isoliert, wie oben beschrieben.

---

<b>Denaturierungslösung</b>	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
<b>Neutralisierungslösung</b>	1 M Tris/HCl 1,5 M NaCl pH 7,5
<b>2 x SSC</b>	300 mM NaCl 30 mM NaCitrat pH 7,0
<b>Hybridisierungspuffer</b>	0,1% Natrium-N- Laurylsarcosinat 1% Blockingreagenz (Boehringer, Mannheim) 0,02% SDS lösen in 5 x SSC
<b>2 x Waschpuffer</b>	0,1% SDS lösen in 2 x SSC
<b>Blockierungspuffer</b>	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1% Blockingreagenz (Boehringer, Mannheim) pH 7,5
<b>TBST-Puffer</b>	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 0,3% Tween 100 pH 7,5



### 12.3 *In vivo*-Excision

Das cDNA-Synthese Kit bietet mit dem ZAP Express Vektor die Möglichkeit, eine effiziente *in vivo*-Excision und Rezirkularisierung des in den  $\lambda$ -Phagen klonierten Inserts durchzuführen. Dazu benutzt man den Helferphagen ExAssist, dessen Proteine in den *E. coli*-Bakterien den Replikationsursprung, der in die Initiations- und Terminationsstelle unterteilt wird, erkennen kann. Beim ZAP Express Vektor werden diese Stellen separat einkloniert und dazwischen befindet sich die Sequenz des Phagemids pBK-CMV, das das einkloniert cDNA-Insert flankiert. Der Helferphage erkennt die Initiationsstelle und verursacht dort eine Kerbe ("Nick"). Ausgehend von dieser Kerbe beginnt nun die DNA-Einzelstrangsynthese bis zur Terminationsstelle. Der so entstandene Einzelstrang enthält notwendigerweise das klonierte Insert und die Sequenz des pBK-CMV. Mit dem Genprodukt II des Helferphagen wird dann der Einzelstrang rezirkularisiert. Es handelt sich hierbei um eine Subklonierung, da alle Sequenzen, die normalerweise zum  $\lambda$ -Vektor gehören, ausserhalb des Initiations-, bzw. Terminationssignals liegen und nicht zirkularisiert werden. Das entstandene Phagemid wird jetzt noch in eine Phagenhülle verpackt und sezerniert.

Anschließend infiziert man *E. coli* des Stammes XL0LR mit dem Phagemid und kann diese auf Agarplatten ausplattieren, die mit selektiven Antibiotika versetzt worden sind. Die *in vivo*-Excision erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### 13. PCR-Techniken

Die "polymerase chain reaction" (Polymerasekettenreaktion) beruht auf der Synthese von DNA-Sequenzen an einer Einzelstrangnukleinsäure, die zwischen zwei vorgegeben Oligonukleotidprimern liegen. Dabei benutzt man temperaturstabile DNA-Polymerasen, die den wiederholten DNA-Synthese- und Renaturierungszyklen der neusynthetisierten DNA-Doppelstränge standhalten.

Zunächst wird in einer Hybridisierungsreaktion der erste Primer an den gewünschten Nukleinsäureeinzelstrang im vorgesehenen 5'-Terminus gebunden. Dann wird mit Hilfe einer Polymerase (Taq-Polymerase oder Pfu-Polymerase) ein DNA-Strang in Richtung auf das 3'-Ende gebildet. Nach thermischer Denaturierung kann der neugebildete DNA-Strang mit einem zweiten Oligonukleotidprimer hybridisieren, der zum neusynthetisierten DNA-Strang komplementär ist. Dieser Zyklus wird bis zu 40 mal wiederholt.

Typischerweise findet die Denaturierung der DNA bei 94°C statt. Das Annealing erfolgt abhängig von Template und Primer bei 49°C bis 60°C, während die Elongation bei 72°C abläuft. Zu Beginn einer PCR wird die DNA zunächst bei 94°C für 3 bis 4 min. denaturiert und zum Abschluß nochmals für 8 bis 10 min elongiert, um der Polymerase die Möglichkeit zu geben alle amplifizierten Stränge zu vervollständigen. Die Taq-Polymerase hängt charakteristisch ein einzelnes, überhängendes Adenosinnukleosidtriphosphat an das 3'-Ende der DNA, was für nachfolgende Klonierungsschritte äußerst günstig ist.

### **Standard-PCR-Ansatz**

5 µl 10 x PCR-Puffer  
5 µl MgCl<sub>2</sub>  
1 µl dNTP-Mix  
1 µl "upstream" Primer  
1 µl "downstream" Primer  
1 µl DNA-Template  
ad 50 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen  
0.5 µl Taq-Polymerase

### **13.1 PCR mit cDNA**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden häufig Klone aus cDNA-Banken amplifiziert. Zum Teil wurden Phagenklone direkt oder die in den pBK-CMV umklonierte cDNA-Klone verwendet.

Falls zu einer bestimmten Sequenz überhaupt keine Informationen vorliegen, hat man mit dieser Methode die Möglichkeit, mit Hilfe von degenerierten Primern ein Stück des gesuchten Gens zu amplifizieren. Diese Primer wurden aus hochkonservierten Bereichen des gleichen Gens bekannter Arten ausgesucht.

Außerdem konnten durch eine Amplifizierung von Plasmid-DNA sehr spezifische Sonden hergestellt werden. Für die Herstellung von Dig-markierten DNA-Sonden wurden mit spezifischen Primern Fragmente aus den entsprechenden Klonen amplifiziert (siehe auch B.9.5).

## 13.2 PCR mit RNA

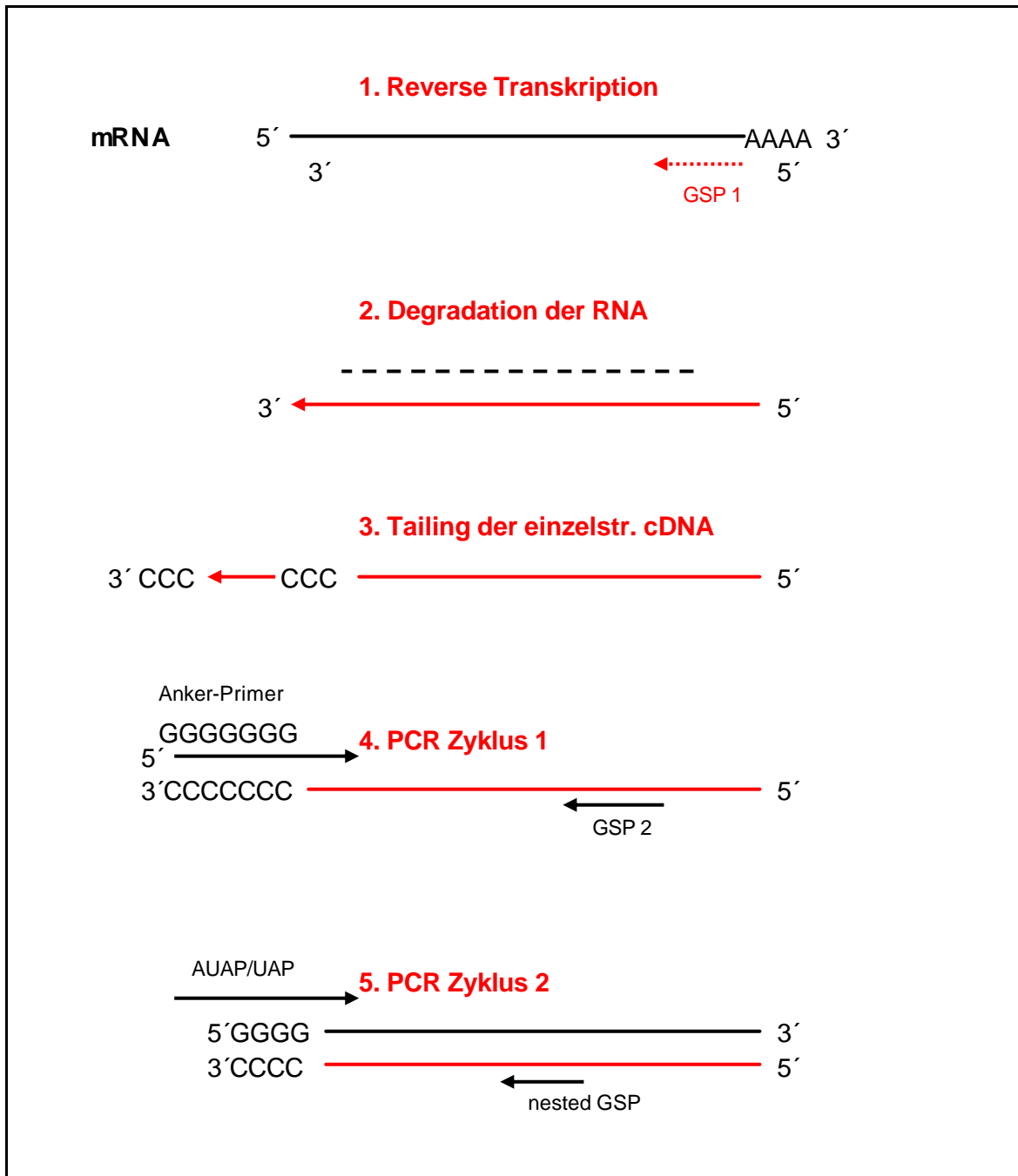
### 13.2.1 RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion)

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) kann man RNA als Template für eine PCR verwenden. Dabei schreibt das Enzym RT die RNA in einzelsträngige cDNA um. In einer zweiten Amplifikation mit Taq-Polymerase wird die cDNA doppelsträngig gemacht. Man kann sowohl gesamt-RNA als auch poly-A<sup>+</sup>-RNA einsetzen. Es werden alle zuvor beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit RNA eingehalten. Zuerst wurde die RNA bei 70°C denaturiert, um Sekundärstrukturen zu zerstören, danach erstellte die RT mit spezifischen Primern die komplementäre cDNA. Im Rahmen dieser Arbeit wurde fast ausschließlich die Reverse Transkriptase SuperScript™ II der Firma Gibco Life Technologies (Karlsruhe) verwendet, deren Temperaturoptimum bei 42°C liegt. Die Reaktion wurde bei 70°C abgestopt und die noch vorhandene RNA durch Zugabe von RNase H degradiert. Die entstandene cDNA war stabil und konnte in folgenden Reaktionen per PCR amplifiziert werden.

### 13.2.2 5'-RACE (Rapid Amplifikation of cDNA Ends)

Häufig sind die cDNA Sequenzen aus Banken am 5'-Endes nicht komplett. Das 5'-RACE-System der Firma Gibco Life Technologies (Karlsruhe) bietet eine Möglichkeit, die unbekannte Sequenz einer RNA oder mRNA aus dem 5'-Bereich zu amplifizieren. Es handelt sich hierbei um eine Abwandlung der RT-PCR. Mit Hilfe des Enzyms Terminale Transferase wird an das 3'-Ende einer einzelsträngigen cDNA ein poly-dC-Schwanz angehängt (tailing). In einem nächsten Schritt kann dann mit einem oligo-dG-Primer und einem sequenzspezifischen Primer das dazwischenliegende, unbekannte Fragment amplifiziert werden. Da dieser Schritt meistens zu keinem eindeutig detektierbaren Fragment führte, wurde eine Reamplifizierung mit einem Ankerprimer und einem sequenzspezifischen "nested" Primer durchgeführt. Die Fragmente konnten dann in einer Gelelektrophorese analysiert, ausgeschnitten und anschließend in einen entsprechenden Vektor kloniert werden (siehe B.9.6 und B.14). Der typische Verlauf einer 5'-RACE ist in Abb. 15 dargestellt.

Der Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet und die spezifischen Primer bei der Firma Roth in Auftrag gegeben. Es wurden für eine Reaktion 1 bis 5 µg gesamt-RNA eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte mit den mitgelieferten GlassMax cDNA Isolations-Säulchen.



**Abb 15: Ablauf der 5'- RACE (Rapid Amplifikation of cDNA-Ends)**

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wird die mRNA ausgehend von einem genspezifischen Primer (GSP 1) in cDNA überschrieben. Nach der Degradation der RNA wird ein oligo-dC-Schwanz an die einzelsträngige cDNA gehängt. Danach folgt die Amplifikation mit einem oligo-dG-Primer und einem spezifischen (GSP 2) und anschließend eine Reamplifikation mit einem sogenannten "abridged universal anchor primer" (AUAP) oder einem "universal anchor primer" (UAP) und einem weiteren spezifischen "nested" Primer.

## 14. Klonierung von PCR-Fragmenten

Um ein PCR Fragment in einen Plasmidvektor zu ligieren, konnte es nach elektrophoretischer Auftrennung aus einem Agarosegel ausgeschnitten und eine Gelextraktion durchgeführt werden (siehe B.9.7). Um ein sinnvolles Verhältnis zwischen Vektor und Insert zu gewährleisten, wurde zuerst eine photooptische Bestimmung der DNA-Konzentration gemacht (siehe B.9.2). Das Verhältnis sollte zwischen 1 : 3 und 1 : 4 liegen. Es wurden folgende Klonierungsvektoren verwendet :

- pGEM-T (Promega, Mannheim)
- pGEM-T easy (Promega, Mannheim)
- PCRII TOPO TA (Invitrogen, Groningen)
- PCRII TOPO XL (Invitrogen, Groningen)

Es handelt sich bei all diesen Klonierungsvektoren um sogenannte TA-Vektoren, was bedeutet, dass sie am 5'-Ende ein dTTP-Nukleosidtriphosphat tragen und die Inserts immer über ein überhängendes Adenosinnukleosidtriphosphat ligiert werden.

Da zur Amplifikation ausschließlich eine Taq-Polymerase verwendet wurde, die ein Adenosinnukleosidtriphosphat an das 3'-Ende anhängt, konnte mit diesen Vektorsystemen ohne weitere Modifikation gearbeitet werden. Die Vektoren lagen linearisiert vor.

### 14.1 Das pGEM-System

Die Ligation wurde entweder über Nacht bei 4°C oder zwei Tage bei 8°C inkubiert. Danach konnten 5 bis 10 ml des Ligationsansatzes in kompetente XL-1 Blue transformiert und auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten, die zur Induktion mit IPTG und zur blau-weiß-Selektion mit XGal versetzt waren, ausplattiert werden (siehe B.8.4). Die positiven Kolonien konnten in Flüssigkulturen vermehrt werden, die Plasmide präpariert und mit Hilfe von Restriktionsenzymen die Inserts herausgeschnitten und auf Agarosegele aufgetragen werden (siehe B.8.5, B.9.3 und B.9.6).

**Standard-Ligations-Ansatz :**

1 µl Vektor (50 ng/µl)  
x µl PCR-Fragment  
5 µl 2 x Ligationspuffer  
1 µl T4-DNA-Ligase  
ad 10 µl mit H<sub>2</sub>O bidest auffüllen

**14.2 Das TOPO-System**

Bei diesem Vektor wird das PCR-Fragment mit dem Enzym Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus inkloniert. Es bindet an doppelsträngige DNA an bestimmten Stellen und schneidet das Phosphodiester Rückrat in einem Strang der DNA auf. Die Energie des aufgebrochenen Phosphodiester wird in Form einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des geschnittenen Stranges und einem Tyrosylrest der Topoisomerase konserviert. Die Bindung zwischen der DNA und dem Enzym wird dann vom 5'-Hydroxylrest des Originalstranges attackiert und löst die reversible Bindung der Topoisomerase. Der Vektor ist somit aktiviert und kann das PCR-Produkt aufnehmen. Die TOPO Klonierungsreaktion kann danach in mitgelieferte kompetente Bakterien TOP10 des Stammes *E. coli* transformiert werden. Mit diesem Vektorsystem kann man von innerhalb etwa 5 min. ein PCR-Produkt klonieren.

**15. DNA-Sequenzierung**

Alle Sequenzierungen wurden von der kommerziellen Firma GENterprise in Mainz nach dem "Taq Dye Terminator Cycle Sequencing"-Prinzip durchgeführt. Die Editierung der Sequenzen erfolgte mit dem Computerprogramm Chromas.

## 16. Sequenzanalyse und Phylogenie

Die Sequenzdaten konnten mit verschiedenen Computerprogrammen bearbeitet werden, die in Tabelle 1 aufgelistet sind.

Um eine Sequenz zu identifizieren wurde zuerst ein Vergleich mit Informationen aus weltweiten Datenbanken durchgeführt (Blast Japan oder Blast NCBI). Danach wurde entweder mit "ClustalX" ein automatisches oder mit "GenDoc" ein manuelles "Alignment" erstellt. Ein „Alignment“ ist ein Vergleich von Sequenzen und stellt eine Hypothese dar, welche Änderungen sich in den untersuchten Sequenzen im Laufe der Evolution ergeben haben. Dabei wurde auf konservierte Bereiche geachtet. Dieses Alignment konnte dann für die Erstellung eines Stammbaumes als Grundlage genommen werden. Für diese phylogenetischen Berechnungen wurde das PHYLIP Package (J. Felsenstein) verwendet. Die Molekülmassen und Signalpeptide der Aminosäuresequenzen konnten mit dem ExpASy Tool ermittelt werden.

**Tabelle 1 : verwendete Computerprogramme**

<b>Datenanalyse</b>	
ExpASy Tool	<a href="http://www.expasy.ch/translate">http://www.expasy.ch/translate</a>
GCG-Software Packet	
<b>Datenbanksuche</b>	
Blast Japan	<a href="http://www.blast.genome.ap.jp/">http://www.blast.genome.ap.jp/</a>
Blast NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
<b>Alignment</b>	
ClustalX 1.64	<a href="ftp://ftg-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/">ftp://ftg-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/</a>
GeneDoc 2.6	<a href="http://www.psc.edu/biomed/genedoc/">http://www.psc.edu/biomed/genedoc/</a>
<b>Stammbaumerstellung</b>	
ClustalX 1.64	siehe oben
PHYLIP 3.6	<a href="http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html">http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html</a>
<b>Stammbaumeditor</b>	
Treeview 1.6	<a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>

Alle im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Stammbäume basieren auf Distanzmatrix- und charakterorientierten Methoden. Bei den Distanzmatrix-orientierten Methoden wird die relative Ähnlichkeit, bzw. die Distanz zwischen zwei Sequenzen in einer Matrix ausgedrückt (z.B. PAM-Matrix oder BLOSUM). In einem ersten Schritt wurden die paarweisen Abstände zwischen den einzelnen Sequenzen berechnet. Dafür gibt es verschiedene Evolutionsmodelle, die die identischen Nukleotide, bzw. Aminosäuren nach einem Algorithmus berechnen und zusätzlich die möglichen Mutationen und Rückmutationen mit einbeziehen. Die PAM-Matrix (Dayhoff, 1978) z.B. ergibt sich aus den Mutationen pro Position, die sich seit der Trennung zweier Aminosäuren ereignet haben. Anhand dieser Abstandsdaten läßt sich dann ein Stammbaum erstellen (z.B. nach der „Neighbor Joining“-Methode). Um einen linearisierten Stammbaum zu erstellen, wurden die Distanzmatrix-Daten in das Microsoft EXCEL 97 Tabellenkalkulationsprogramm importiert. Für eine statistische Überprüfung des Ergebnisses wurden die Bootstrap-Werte berechnet. Dabei werden nach einem Zufallsprinzip einzelne Positionen innerhalb eines Alignments dupliziert und andere deletiert. Die Gesamtlänge der Sequenz bleibt jedoch erhalten. Dadurch wird jeder Position ein unterschiedliches Gewicht zugewiesen, da manche Positionen mehrfach und andere gar nicht ausgewählt werden. Die entstandenen Teildatensätze (Pseudosamples), meist werden hundert erstellt, wurden mit den oben beschriebenen Methoden analysiert. Ein Bootstrap-Wert von 80 bedeutet, dass in 80% der Fälle die Sequenzen einander zugeordnet werden, d.h diese Verzweigung im Stammbaum ist zu 80% unterstützt.



## **C. Ergebnisse**

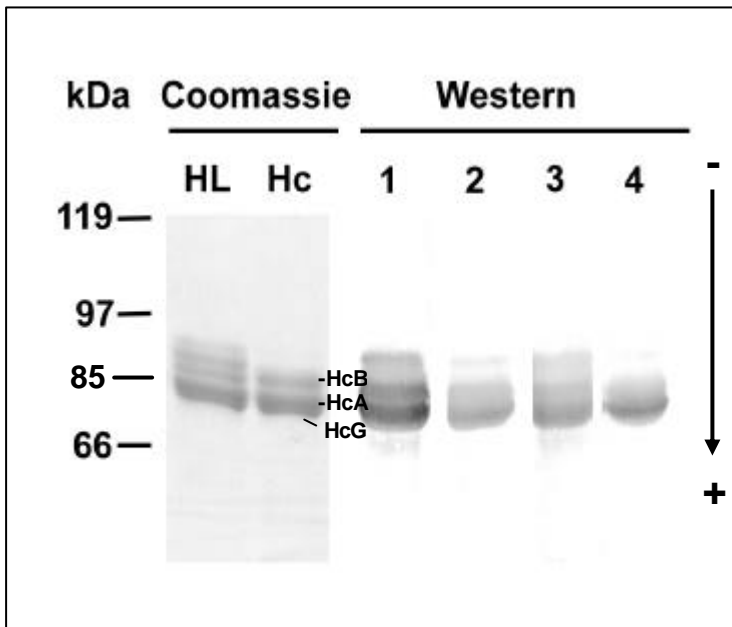
### **1. Die Hämocyane der Crustaceen**

In früheren Untersuchungen wurden schon zahlreiche Hämocyane der „höheren“ Krebse (Malacostraca) auf immunologischer und proteinbiochemischer Ebene charakterisiert (Übersichtsartikel: Markl, 1986; Markl und Decker, 1992), doch Sequenzdaten aus dieser Gruppe sind noch sehr unvollständig (Burmester, 2001; Burmester, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher mehrere Untereinheiten der Hämocyane von *Homarus americanus* und *Palinurus elephas* auf cDNA-Ebene sequenziert werden.

#### **1.1 Das Hämocyanin des amerikanischen Hummers *Homarus americanus***

##### **1.1.1 Biochemische Charakterisierung des Hämocyanins von *Homarus americanus***

Die Proteine der zellfreien Hämolymphe des Hummers und gereinigtes Hämocyanin wurden in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt. Die SDS-PAGE des 2 x 6 Hämocyanins zeigte deutlich drei verschiedene Banden mit Molekülmassen im Bereich von 75 bis 80 kDa. Diese entsprachen den bereits bekannten  $\alpha$ - (HcA),  $\beta$ - (HcB) und  $\gamma$ - (HcG) Untereinheitstypen (Markl, 1986). Außerdem waren noch andere Hämolympheproteine und das nichtrespiratorische Pseudohämocyanin im Gel als Banden zu sehen (Markl *et al.*, 1979; Burmester, 1999). In einem Westernblot wurden die Proteine mit vier verschiedenen Antiseren gegen *Homarus*-Hämocyanin nachgewiesen (Abb. 16). Lediglich Antiserum 4 erwies sich als Hämocyanin-spezifisch. Die anderen verwendeten Seren (1-3) erkannten auch das Pseudohämocyanin.



**Abb 16: SDS-PAGE und Westernblot der Hämolympheproteine von *Homarus americanus***

Die Proteine der Hämolymphe und gereinigtes Hämocyanin wurden in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt. Ein Westernblot wurde mit vier verschiedenen Antiseren gegen *Homarus*-Hämocyanin (1 bis 4) durchgeführt. Die Zuordnung der Banden erfolgte nach Markl et al., 1979 und Burmester, 1999. Lediglich Antiserum 4 erwies sich als Hämocyaninspezifisch.

### 1.1.2 N-terminale Sequenzen des Hämocyanins von *Homarus americanus*

Die Analyse der N-terminalen Sequenzen der Hämocyaninuntereinheiten wurde von Dr. H. Heid, Deutsches Krebsforschungszentrum (Heidelberg) durchgeführt. Dazu wurden Proteine, die vorher auf eine PDVF-Membran transferiert worden waren, ausgeschnitten und einem Edman-Abbau unterworfen. Die Ermittlung der Aminoenden der drei Banden ergab drei verschiedene Sequenzen zwischen 20 und 22 Aminosäuren. Die obere Bande wurde als HcB durch Vergleiche mit bekannten Hämocyaninsequenzen anderer Crustacea identifiziert und hat folgende Aminosäuresequenz : DTDVAHKQQS VNRLLYKVTS HI. Die mittlere Bande wurde als HcA identifiziert : DASGDSTAKX QQDVNHLLDX IY und die untere entsprach laut Sequenzvergleich der Untereinheit HcG : DSPGVSEVNV AQKQHVDNFL. In der HcB-Bande tauchte eine leichte Verunreinigung auf, deren Sequenz identisch mit HcA zu sein scheint (HcA'): DASGDSTAKX QQDVNXXXDX IY

### 1.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung des Hämocyanins von *Homarus americanus*

Zu Beginn meiner Arbeit lag bereits eine cDNA-Bank aus RNA verschiedener Gewebe von *Homarus* vor, die Dr. T. Burmester im Rahmen seiner Untersuchungen zum Pseudohämocyanin erstellt hatte (Burmester, 1999). Die vorhandene cDNA-Bank wurde mit einer Mischung sechs verschiedener polyklonaler anti-*Homarus*-Hämocyanin-Antikörper durchgemustert. Insgesamt wurden über vierzig positive Klone gefunden, von denen dreizehn mit Insertgrößen zwischen 500 und 1800 bp sequenziert wurden. Durch Vergleiche mit den N-terminalen Sequenzen und anderen Crustaceen-Hämocyaninen konnten alle diese Klone dem  $\alpha$ -Typ-Hämocyanin zugeordnet werden. Durch Restriktionsverdau und Vergleich der Restriktionsmuster konnte gezeigt werden, dass fast alle Klone einem einzigen Sequenztyp angehören. Es wurde nur eine Ausnahme gefunden (Klon 222.1), repräsentiert anscheinend ein Allel oder ein anderes Gen des Typs  $\alpha$ . Der Klon ist unvollständig, aber durch einen Vergleich der sequenzierten Region (336 bp) mit den anderen Sequenzen konnte ein Unterschied in 22 bp festgestellt werden.

Leider waren alle gefundenen positiven Klone unvollständig. Die komplette Sequenz des HcA konnte durch eine Kombination von zwei verschiedenen, jedoch in 242 bp überlappenden Klonen zusammengesetzt werden, von denen der eine ein vollständiges 5'-Ende und der andere ein vollständiges 3'-Ende hat. In der Überlappung gab es keine Unterschiede und so kann man von einer einzigen cDNA ausgehen. Auf diese Weise erhielt ich die vollständige Sequenz des HcA mit einer Länge von 2246 bp und einem offenen Leserahmen von 2016 bp. Die Sequenz hat einen 21 bp langen poly(A) Schwanz und ein alternatives Polyadenylierungssignal (ATTAAA) ist 21 bp vor (upstream) der Polyadenylierungsstelle zu finden.

Die translatierte Sequenz des Klons von HcA ist komplett bis auf das Signalpeptid (Abb. 17). Das native HcA ist ein Polypeptid aus 654 Aminosäuren und einer errechneten Molekülmasse von 75,5 kDa. Dies stimmt mit den Daten der SDS-PAGE überein. Die Sequenz ist in der EMBL/Genbank unter der Accession-Nummer AJ 297738 verfügbar.

## HamHcA

CACACTGGTGGCCGCGGCTGCTGCCTGGCCAAGCTTCAGCTACCAGAACGACGCTTCCGGTGACAGTACAGCCAAGAGACAACAGGATGT 90  
**T L V A A A A A W P S F S Y Q N** **D A S G D S T A K R Q Q D V** 30  
CAACCATCTGCTGGATAGAATTACGACCATCTTCATTATCCGACCTGAAGCAAATCTCCGAGACCTTCAGCCCTGAGGCTGACACTTC 180  
**N H L L D R I Y** D H L H Y S D L K Q I S E T F S P E A D T S 60  
CATGTATACAGATGGTGGCACAGCCGCCATCATCTTATGGAAGAGCTCAATGATCACAGATTCTTGAGCAGCATCATTGGTTCTCTCT 270  
M Y T D G G T A A H H L M E E L N D H R F L E Q H H W F S L 90  
TTTTAACCTCGCCAGCGTGAAGAAGCTCTCATGCTTTTGTGATGCTGACTGCAAGTCTTGGGAGTGCTTTGTTGACAATGCCGC 360  
F N P R Q R E E A L M L F D V L M H C K S W E C F V D N A A 120  
CTTCTCCGTGAACGTATGAATGAAGGAGAATTCGCTTACGCACTCTATACAGCAGTTATCCACTCTGAGTTGGGACAAGGGATTGTATT 450  
F F R E R M N E G E F A Y A L Y T A V I H S E L G Q G I V L 150  
ACCTCCACTCTACGAAATCACTCCCATATGTTACCAACAGTGAATCATCCACAAGGCTTACACTGCCAAGATGACCCAGACACCAGG 540  
P P L Y E I T P H M F T N S E I I H K A Y T A K M T Q T P G 180  
CAGGTTTGAGATGAAATTCACAGGGACGAAAAGAACAAGGAACAAGAGTGGCCTACTTCGGTGAGGACATTGGCCTCAATATCCACCA 630  
R F E M K F T G T K K N K E Q R V A Y F G E D I G L N I H **H** 210  
CGTACTTGGCATATGGACTTCCCCTTCTGGTGAAGGACTCCTATGGTTACCATCTTGATCGCAAGGGCGAGCTATTCTTCTGGGCCCA 720  
V T W **H** M D F P F W W K D S Y G Y H L D R K G E L F F W A **H** 240  
TCATCAACTCACTGTACGCTTTGACGCTGAGCGCCTCTTAAGTGGCTAGACCCAGTTGACGAGCTTCACTGGGAGCGTATTATTCATGA 810  
H Q L T V R F D A E R L S N W L D P V D E L H W E R I I H E 270  
AGGTTTTCACCACATACCAGCTACAAGTATGGTGGTGGTTCCTGCACGCTCCTGACAACGTACACTTTGAGGATGTGGACGGTGTAGC 900  
G F A P H T S Y K Y G G E F P A R P D N V H F E D V D G V A 300  
TCACGTGCGTGACATGATTATCATCGAGAGTCGCATTTCGTGACGCCATTGCTCACGGTTACGTGACCGACAATCATGGTGATAACATCAA 990  
H V R D M I I I E S R I R D A I A H G Y V T D N H G D N I N 330  
TATCAGGAATGATCATGGCATTGACGTCCTCGGGACATCATTGAATCATCCGTGTACAGCCCCAACGCCAGTATTATGGTGCCTGCA 1080  
I R N D H G I D V L G D I I E S S V Y S P N A Q Y Y G A L **H** 360  
CAACTGCTCACATAATGCTTGGTCGACAAGGTGATCCCCATGGCAAATTCACATGCCTCCCGGTGTGATGGAACACTTTGAGACTGC 1170  
N T A **H** I M L G R Q G D P H G K F N M P P G V M E H F E T A 390  
CACCCGACCCAAGTTTCTTCCGACTACACAAATACATGGATAACATCTTTAAGGAACACAAGGACTCACTTCTCCTTACACCAAAGC 1260  
T R D P S F F R L **H** K Y M D N I F K E H K D S L P P Y T K A 420  
TGACATTGAGTTTACTGGTGTGGCGGTTGAAGAAGTTGAAATGTTGGGCAGCTAAATACATTCTTTGATGAATTTGAATTCAGTCTCGG 1350  
D I E F T G V A V E E V E I V G Q L N T F F D E F E F S L G 450  
CAATGCTGGATGAATTAGAAAAAGTTCATGATGTAGCCATTAGCGCATATGTCCACCGTCTTAACCATGAAGAATTTAGTTACAAAAT 1440  
N A V D E L E K V H D V A I S A Y V H R L N H E E F S Y K I 480  
TCTCGTCCAAAACAACAAGGTGACATCCTGGCCACCGTCCGTATCTACTTATGTCCCCTGTTGATAACAA CCATATACACATCCC 1530  
L V Q N N N E G D I L A T V R I Y L C P T V D N N H I H I P 510  
TTTGTGGAAGGACACTGGACCTGCATTGAGATGGCAAGTCTACAAGCAATTAATAACTGGATCAACAAGATCGATCGCAAGTCTAC 1620  
L S E G H W T C I E M D K F Y K Q L K T G S N K I D R K S T 540  
CGAGTCTTCGGTGACTGTTCTGATTTCATTGAGCTTAGCAGAATTCACGAGAAGACTGACCAGGCCGTAGCCAGCGGCAGCAAATTTGA 1710  
E S S V T V P D S L S L A E L H E K T D Q A V A S G S K L D 570  
CCTGCACGAGTACGAGCGATCATGTGGCCTTCTGCCAGATTGCTCCTGCCTAAGGGAACAGTCAACGGTATGGACTTCGACCTGTTTGT 1800  
L H E Y E R S C G L P A R L L L P K G T V N G M D F D L F V 600  
GGCTGTGACCAACGGTGTGAGGATAAAGTACAGACCATCCCGAGACTGACGAACACGGAGGCACCCATGCTCAATGTGGCGCCCATGG 1890  
A V T N G D E D K V T D H P E T D E H G G T H A Q C G A H G 630

TGAAAAATACCCAGACAAGAAGCCCATGGGCTACCCACTAGAACGTAGCATTCCTGATGAACGAGTCTCCATGATGTGCTAATATTAA	1980
E K Y P D K K P M G Y P L E R S I P D E R V F H D V A N I N	660
TGTCACCCATGTGAAGGTATTCTTTAAGAAGAACAT <b>TAA</b> ATTACATACAAAATTATCATATTGTCAAACCTAAGATGAACACCTATTAG	2070
V T H V K V F F K E E H *	690
TTTTTCTTAAAAATTGAAATAATTTAAAAATACTGGCTTATGAAAATTCGCCATTGACTATCATTTTTTTCTATTGGGTATTACCATT	2160
TATGTTATTGAAAGGTTCTTCTAATTTTCAGTTAAATGAAGTTTAAAGTGAATGTCTTCAAAAAC <b>ATTAAA</b> AATATACTGGCAATCAAAAA	2250
AAAAAAAAAAAAAAAAA	2266

**Abb. 17: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Homarus americanus* HcA**

Abgebildet ist die komplette Nukleotidsequenz des *Homarus* Hämocyanins HcA, sowie die Translation in Aminosäuren.

Signalpeptid : gelb unterlegt

Stopcodon : Rot unterlegt.

Polyadenylierungssignal : liegt 21 bp vor dem PolyA<sup>+</sup>-Schwanz und ist violett unterlegt.

Die Histidine, die mit den Kupferionen der Kupferbindungsstelle koordiniert sind, sind blau unterlegt.

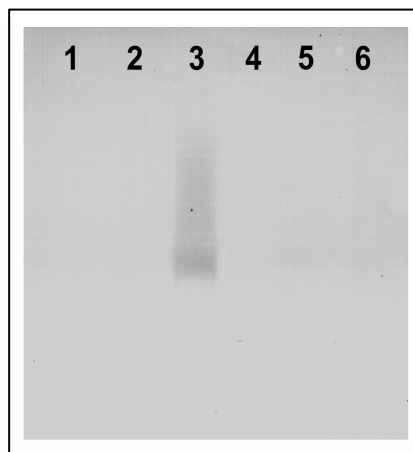
Die Ergebnisse der Proteinsequenzierung sind unterstrichen.

#### 1.1.4 Identifizierung des Expressionsortes von Hämocyanin

Um Informationen über den Expressionsort des Hämocyanins bei *Homarus americanus* zu erhalten, wurde ein Northernblot mit verschiedenen Geweben durchgeführt. Dazu wurde die RNA aus thorakalem Bindegewebe, Kiemen, Mitteldarmdrüse, Muskel, Ovar und Herz präpariert, jeweils ca. 15 µg gesamt RNA in einem Agarosegel separiert und auf eine Nylonmembran transferiert.

Die RNA wurde mit einer spezifischen, Dig-markierten RNA-Sonde, die über eine *in vitro*-Transkription hergestellt wurde (siehe B.9.5.2), nachgewiesen (Abb. 18).

Dabei konnte deutlich gezeigt werden, dass Hämocyanin ausschließlich in der Mitteldarmdrüse exprimiert wird (siehe Senkbeil und Wriston, 1981).



**Abb. 18: Northern Blot mit RNA verschiedener Gewebe von *Homarus americanus***

Etwa 15 µg gesamt-RNA verschiedener Gewebe von *Homarus americanus* wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und mit einer Dig-markierten RNA-Sonde detektiert.

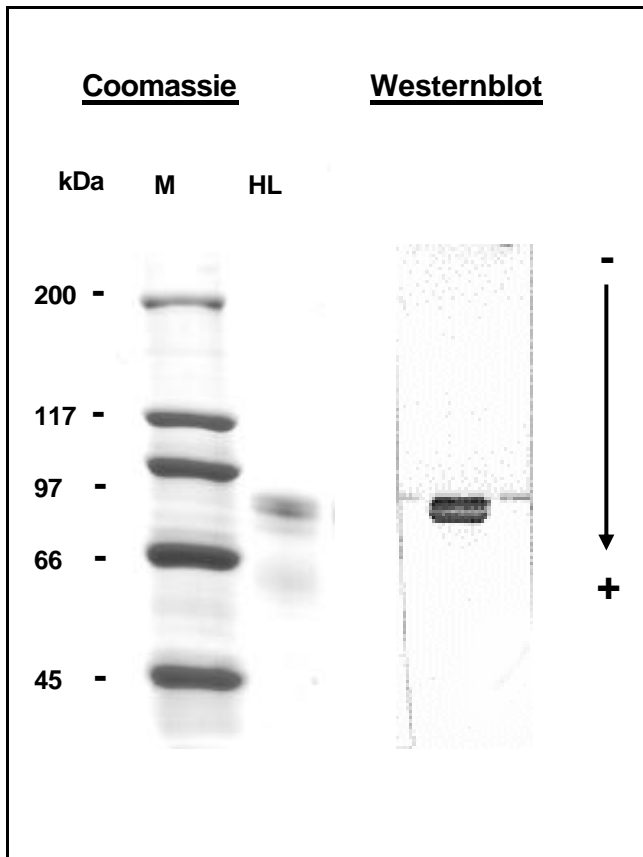
(1) Bindegewebe, (2) Kiemen, (3) Mitteldarmdrüse, (4) Muskel, (5) Ovarien, (6) Herz.

## 1.2 Das Hämocyanin der Languste *Palinurus elephas* (synonym : *P. vulgaris*)

### 1.2.1 Biochemische Charakterisierung des Hämocyanins von *Palinurus elephas*

In einer SDS-PAGE mit 7,5% Polyacrylamid wurden mindestens zwei Banden mit einer Molekülmasse von etwa 75 kDa aufgetrennt. Die von Markl *et al.* (1979) beschriebene Auftrennung in sechs verschiedene Banden wurde nicht erhalten. In einem Westernblot wurden zwei klar erkennbare Banden mit einem Gemisch aus verschiedenen Antiseren gegen *Palinurus*-Hämocyanin detektiert (Abb. 19). Bei den beiden Banden handelt es sich wahrscheinlich um jeweils mehrere Untereinheiten, die jedoch in ihren Laufeigenschaften sehr ähnlich sind und deshalb nicht aufgetrennt wurden. Alle Untereinheiten entsprechen dem  $\alpha$ -Typ, da diese von einem Antiserum gegen  $\alpha$ -Hämocyanin, jedoch nicht von einem gegen die  $\gamma$ -Untereinheit gerichteten Antiserum erkannt wurden (Markl, 1986).





**Abb 19: SDS-PAGE und Westernblot von Hämolympheproteinen von *Palinurus elephas***

Durch eine Säulenchromatographie gereinigtes Hämocyanin wurde in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt. Man kann mindestens zwei distinkte Untereinheiten im Bereich von etwa 80 kDa erkennen. In Westernblot konnten diese mit einem Gemisch von anti-*Panulirus*-Hämocyanin-Antikörper detektiert werden.

### 1.2.2 Molekularbiologische Charakterisierung des Hämocyanins von *Palinurus elephas*

Aus der Mitteldarmdrüse wurde die Gesamt-RNA präpariert und daraus mit dem PolyAtract Kit (Promega) die mRNA isoliert. Für die Synthese der cDNA-Bank (Stratagene) wurden etwa 5 µg PolyA<sup>+</sup>-RNA eingesetzt. Der Primärtiter der cDNA-Bank betrug etwa 300 000 pfu/ml und konnte zu einem Endtiter von etwa  $1.3 \times 10^9$  pfu/ml amplifiziert werden. Die cDNA-Bank wurde mit einem Gemisch verschiedener anti-*Palinurus*-Hämocyanin-Antikörper durchsucht.

Es wurden neun positive Klone mit Insertgrößen zwischen 1,5 und 3,8 kb ansequenziert und als Hämocyanin identifiziert. Durch eine Sequenzierung mit den Promotorprimern T3 und T7 und anschließend „primer walking“ wurden drei verschiedene Untereinheiten identifiziert, die PelHc1, PelHc2 und PelHc3 genannt wurden. Die Unterschiede der drei Untereinheiten betragen auf Nukleotidebene etwa 2-3 % und es konnte durch Sequenzvergleiche festgestellt werden, dass es sich bei allen Sequenzen um Untereinheiten des  $\alpha$ -Typs (Markl, 1986) handelte. Das Hämocyanin von *Palinurus* trägt ein Signalpeptid am 5'-Ende. Die Polyadenylierungssignale (AATAAA) liegen bei allen drei Sequenztypen 19 bp vor dem PolyA<sup>+</sup>-Schwanz (Abb. 20, 21 und 22). Bei einer Translation in Aminosäuren ergibt sich ein offener Leserahmen von 2052 bp (PelHc1 und PelHc2), bzw. 2055 bp (PelHc3). Die Berechnung der Molekülmassen mit dem ExPASy Tool „Compute pI/Mw“ ([www.expasy.ch/translate](http://www.expasy.ch/translate)) ergibt für alle drei gefundenen Untereinheiten Molekülmassen von 75 kDa. Das bestätigt die biochemischen Ergebnisse und stimmt ebenfalls mit Werten aus der Literatur überein (Markl *et al.*, 1979; Markl, 1986). Die verschiedenen Untereinheiten haben wahrscheinlich sehr ähnliche Laufeigenschaften, was erklären kann, dass in der SDS-PAGE nur zwei distinkte Hämocyanin Banden zu sehen waren. Die Sequenzen von PelHc1, PelHc2 und PelHc3 sind in der EMBL/Genbank unter den Accession-Nummern AJ 344361, AJ 344362 und AJ 344363 verfügbar.

PeIHc1

AAGGTCCTGGTCTTGTGCGCGCTAGTGGCCA CAGCTGCCGCTTGGCCAAGCTTCAGCGGTGAACCTACTAATGGTTTCCAAGCGACGT 90  
K V L V L C A L V A T A A A W P S F S G E L T N G F Q S D V 30  
CCACTCATCCGATAACGCCATAAACACAGGATGTCAACCATCTGCTGGACAAGATCTACGAGCCATAAAAGATGAGGAACCTGCACAA 180  
H S S D N A H K Q Q D V N H L L D K I Y E P I K D E E L H N 60  
CATAGCACAAACCTTTGACCCTGTGGCCGACACCTCCATATATGGTGACGTAGGTGCAGCCGCCAAAACGCTTATGCAGGAACCTAACGA 270  
I A Q T F D P V A D T S I Y G D V G A A A K T L M Q E L N D 90  
TCATAGACTGTGGAACAGCATCATTGGTTCTCACTTTTAACTCGCCAGAGGAAGAAGCACTCATGCTTTTTACGGTTCTGAATCA 360  
H R L L E Q H H W F S L F N T R Q R E E A L M L F T V L N Q 120  
GTGCAAGGATTGGAACGTTTTTCTTAATAACGCCCTTCTTTCGTGAGAGGATGAATGAGGGAGAGTTTGTGTATGCACCTCTATGTGAG 450  
C K D W N C F L N N A A F F R E R M N E G E F V Y A L Y V S 150  
TGTCATCCACTCTAAACTGGGAGATGGTATTGTTCTGCCTCCACTCTACGAAGTCACCCCTCACATGTTTACAAAACAGTGAAGTCATCGA 540  
V I H S K L G D G I V L P P L Y E V T P H M F T N S E V I D 180  
CAAGGCTTACTCCGCCAAGATGACCACAAAGAAGGTACATTTAACATGAGCTTCACAGGAACATAAAAAGAACAAGAACAACGAGTGGC 630  
K A Y S A K M T H K E G T F N M S F T G T K K N K E Q R V A 210  
CTACTTCGGGGAAGATATTGGCATGAACATCCACCACGTTACTTGGCATATGGACTTCCCCTTCTGGTGGGACGATTCTATGGTTATCA 720  
Y F G E D I G M N I H H V T W H M D F P F W W D D S Y G Y H 240  
TCTGGATCGCAAGGGTGAGCTCTTCTTCTGGTCCACCACGCTCACTGCCCGCTTTGACGCAGAACGTCTCTCCAACCTGGATGGAACC 810  
L D R K G E L F F W V H H Q L T A R F D A E R L S N W M E P 270  
CGTTGACGAACATACATTGGGACGACATTATCCACGAGGGATTGTCCACACACTAGTTACAAGTATGGTGGTGAAGTCCCTGTACGTCC 900  
V D E L H W D D I I H E G F A P H T S Y K Y G G E F P V R P 300  
AGACAACATCCGTTTTCGAAGATGTGGACGGTGTAGCTCATGTGCATGACATGGAATCACAGAGAACCGCATTCGTGACGCAATTGTCTCA 990  
D N I R F E D V D G V A H V H D M E I T E N R I R D A I A H 330  
CGTTTACATCACGCCACCGATGGACACACAATCGACATCAGGCAACCTAATGGCATCGAACTCCTGGGAGACATCATCGAATCCTCCAT 1080  
G Y I T A T D G H T I D I R Q P N G I E L L G D I I E S S M 360  
GTACAGTTCTAACCACACTATTATGGTTCCCTGCACAACACTGCTCACATGATGCTTGGTGCACAGGGTGAATCCTCATGGCAAGTTCGA 1170  
Y S S N P H Y Y G S L H N T A H M M L G R Q G D P H G K F D 390  
CATGCCTCCCGGTGTTATGGAGCATTTTGGAGACTGCCACACGCGACCAAGTTTCTTCAGACTGCACAAATA TATGACAACATCTTCAA 1260  
M P P G V M E H F E T A T R D P S F F R L H K Y M D N I F K 420  
GGAACACACAGACTCTTCCCTCCCTACCCATGAAGACCTCGAGTTCCCGGTGTTTCAGTGGACAATATTGCTATTGATGGACACCT 1350  
E H T D S F P P Y T H E D L E F P G V S V D N I A I D G H L 450  
TACTACATTCTTCGATCAGTTCAAATACAGTCTTGTAAATGCTGTGGATTGAGGTGAAAACGTAGAGGATGTGGCAATCTATGCCAATGT 1440  
T T F F D Q F K Y S L V N A V D S G E N V E D V A I Y A N V 480  
TCATCGCCTTAACCATGAAGAATTTACTTATGAGATTGAGGTGAGGAACCAACGAAGAGAAAATTTGCTACCGTCCGCATTTTCTTGTG 1530  
H R L N H E E F T Y E I E V R N H N E E K F A T V R I F L C 510  
CCCTACTGAGGATAATAATGGCATAACCTTGAACCTAGATGAAGAACGTTGGCTTGGCTTGAAATGGACAAGTTCTGGAGAAAACCTGGC 1620  
P T E D N N G I T L N L D E E R W L C L E M D K F W R K L A 540  
CAATGGAATAAATAAGAACGAGTCTTAAGGACTCGTGGTACCGTCCCTGATATGCCAAGCTTTGAATCGCTGAAGCACCAAGC 1710  
N G K N L I E R S S K D S S V T V P D M P S F E S L K H Q A 570  
TGATGAAGCGGTAAGAACGGAGAAGACCTGGACCTGAGTGCGTATGAACGGTCTTGTGGCATCCCCGACAGAATGCTGCTACCCAAGAG 1800  
D E A V K N G E D L D L S A Y E R S C G I P D R M L L P K S 600  
CAAGCCTCAGGGTATGGAATTAACCTATACGTGGTTGTGACTGACGGTGACAAGGATACAGATGGAAGTGTGAGGACCACGATCATCA 1890  
K P Q G M E F N L Y V V V T D G D K D T D G S D G D H D H H 630

CGGCACCCACGCTCAGTGTGGCATTACGGTGAACAGTATCCAGACCATCGGCCTTTGGGTTATCCACTGGAACGTCGCATTCTCTGATGA	1980
G T H A Q C G I H G E Q Y P D H R P L G Y P L E R R I P D E	660
ACGCGTCTTTGATGGCGTTTCAAACATCAAGCACGCACCTCGTCAAGATCGTCCATGACCCAGAGCTTCGTGCTTGA	2070
R V F D G V S N I K H A L V K I V H D P E L R A *	690
GTATGATCAAAATTATGACTGACCTGTTTATGGATCATTTTAGTAAACATCAGAATGTTTCGTGTGTTCAACAACCTTAGTTCATTCTTAA	2160
CCTGAGTATAGTCTCAACAAAATCTTCTGTTTAGAATTTATAACAAAATAGGACAATGTACCAAAATTTGATAATATTATTATCCCAC	2250
ATAAA	2286
GAATATCTGCATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

**Abb. 20: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Palinurus elephas* Hc1**

Abgebildet ist die komplette Nukleotidsequenz des *Palinurus* Hämocyanins Hc1, sowie die Translation in Aminosäuren.

Signalpeptid : gelb unterlegt

Startcodon : unvollständig, teilweise markiert.

Stopcodon : Rot unterlegt.

Die potentielle Glykosilierungsstelle ist mit blauen Buchstaben markiert (NMS).

Polyadenylierungssignal : liegt 19 bp vor dem PolyA<sup>+</sup>-Schwanz und ist violett unterlegt.

Die Histidine, die mit den Kupferionen der Kupferbindungsstelle koordiniert sind, sind blau unterlegt.

PeIHc2

AAGGTCCTGGTCTTGTGCGCGCTAGTGGCCACAGCTGCCGCTTGGCCAAGCTTCAGCGGTGAACTTACTAACGGTTTCCAAAGTGACGTC 90  
**K V L V L C A L V A T A A A W P S F S G E L T N G F Q S** D V 30  
 CACTCATCCGATAACGCCATAAAACAACAGGATGTCAACCATCTGCTGGACAAGATCTACGAGCCATAAAAAGATGAGGAAGTGCACAAC 180  
 H S S D N A H K Q Q D V N H L L D K I Y E P I K D E E L H N 60  
 ATAGCACAAACCTTTGACCCTGTGGCCGACACCTCCATATATGTTGACGATGGTGCAGCCGCAAAACGCTTATGCAGGAACCTTAACGAT 270  
 I A Q T F D P V A D T S I Y V D D G A A A K T L M Q E L N D 90  
 CATAGACTGTTGGAGCAGCATCATTGGTTCCTCACTTTTCAACACTCGCCAGAGGGAAGAAGCACTCATGCTTTTACTGTTCTGAATCAG 360  
 H R L L E Q H H W F S L F N T R Q R E E A L M L F T V L N Q 120  
 TGCAAGAATTGGAAGTGTTCCTGTAATAACGCCGCTTCTTTTCGTGAGAGGATGAATGAGGGAGAGTTTGTGTATGCACTCTATGTGAGT 450  
 C K N W N C F R N N A A F F R E R M N E G E F V Y A L Y V S 150  
 GTCATCCACTCTAAACTGGGAGATGGTGTGTTCTGCCTCCACTCTACGAAGTCAACCCCTCACATGTTTACAAATAATGAAGTCATCGAC 540  
 V I H S K L G D G V V L P P L Y E V T P H M F T N N E V I D 180  
 AAGGCTTACTCTGCCAAGATGACCCACGAAGGAAATACATTTGACATGAGCTTCACAGGAACAAAAAGAACAGAGAACAACAGAGTGGCC 630  
 K A Y S A K M T H E G N T F D M S F T G T K K N R E Q R V A 210  
 TACTTCGGGGAAGATATTTGGCATGAACATCCACCAGTTACTTGGCATATGGACTTCCCTTCTGGTGGCAAGATTCTATGGTTATCAT 720  
 Y F G E D I G M N I H **H** V T W **H** M D F P F W W Q D S Y G Y H 240  
 CTGGATCGCAAGGGTGAGCTCTTCTTCTGGGTCCACCACCAGCTCACTGCCGCTTTGACGCAGAACGTCCTCTCCAAGTGGATGGATCCC 810  
 L D R K G E L F F W V **H** H Q L T A R F D A E R L S N W M D P 270  
 GTTGACGAAGTACATTGGGAGGAGTTATCCACGAGGATTTGCTCCACACGCTAGTTACAAGTATGGTGGTGGTTCCTACACGTCCTCA 900  
 V D E L H W E E V I H E G F A P H A S Y K Y G G E F P T R P 300  
 GACAACACCCAATTCAAAAATGTGGACGCGTAGCTCGTGTGCGTGACATGGAATCAGAGAGCCGCATTGCTGACCAATTGCTCAC 990  
 D N T Q F K N V D G V A R V R D M E I T E S R I R D A I A H 330  
 GGTACATCACGGCCACCGATGGACACACAATCGACATCAGGCAACCTAATGGCATCGAACTCCTGGGAGACATCATCGAATCCTCCATG 1080  
 G Y I T A T D G H T I D I R Q P N G I E L L G D I I E S S M 360  
 TACAGTTCTAACCCACAATATTATGGTCCCTACACAACACTGCTCACATGATGCTTGGTCGACAGGGTGATCCTCATGGCAAGTTCGAC 1170  
 Y S S N P Q Y Y G S L **H** N T A **H** M M L G R Q G D P H G K F D 390  
 ATGCTCCCGGTGTTATGGAGCATTTTGGAGCAGCTACACGCGACCCCAAGTTTCTTCAGACTGCACAAATATATGGACAACATCTTCAAG 1260  
 M P P G V M E H F E T A T R D P S F F R L **H** K Y M D N I F K 420  
 GAACACACAGACTCTTTCCACCCTACCCATGAAGACCTCGAGTTCGCCGTTTTCAGTGAAAAATATTGCTATTGATGGACACCTC 1350  
 E H T D S F P P Y T H E D L E F P G V S V E N I A I D G H L 450  
 ACTACATCTTCGATCAGTTCAAATACAGTCTTGTAAATGCTGTGGATTGGGAGAAAAATAGAGGATGTGGAAATCTATGCCAATGTT 1440  
 T T F F D Q F K Y S L V N A V D S G E N I E D V E I Y A N V 480  
 CATCGCCTTAACCATGAAGAATTTACTTATGTCATTGAGGTCAGCAACGCCAACGAAGTGCATTTAGCTACCGTCCGCATTTTCTTGTGC 1530  
 H R L N H E E F T Y V I E V S N A N E V H L A T V R I F L C 510  
 CCTACCGAGGATAATAATGGCATAACCTTGAACCTAGATGAAGAACGTTGGCTTTGCCTTGAATTGGACAAGTTCTGGACAAAACCTGGCC 1620  
 P T E D N N G I T L N L D E E R W L C L E L D K F W T K L A 540  
 AATGGAAAAATCTAATAGAACGCAGTTCTAAGGACTCGTCGGTGACCGTCCCTGATATGCCAAGCTTTGAATCGTGAAGCACCAAGCT 1710  
 N G K N L I E R S S K D S S V T V P D M P S F E S L K H Q A 570  
 GATGAAGCGGTAAAGAACGGAGAAGACCTGGACCTGAGTGCATGAACGGTCTTGTGGCATCCCCGACAGAATGCTGCTACCCAAGAGC 1800  
 D E A V K N G E D L D L S A Y E R S C G I P D R M L L P K S 600  
 AAGCCTCAGGGTATGGAATTCACCTATACGTGGCTGTGACTGACGGTGACAAGGATACAGATGGTAGTGGAGACCACGATCATCAC 1890  
 K P Q G M E F N L Y V A V T D G D K D T D G S D G D H D H H 630

GGCACCCACGCTCAGTGTGGCATTACGGTGAACAGTATCCAGACCATCGGCCTTGGGTTATCCACTGGAACGTGCGCATTCTGATGAA	1980
G T H A Q C G I H G E Q Y P D H R P L G Y P L E R R I P D E	660
CGCGTCTTTGATGGCGTTTCAAACATCAAGCACGCACTCGTCAAGATCGTCCATGACCCAGAGCTTCGTGCT TGA GTTTCCTTCTCATAG	2070
R V F D G V S N I K H A L V K I V H D P E L R A *	690
TATGATCAAAATTATGACTGACCTGTTTATGGATCATTTTAGTAAACATCAGAATGTTTCGTGTGTTCAACAACCTTTAGTTCATTCTTAAC	2160
CTGAGTATAGTCTCAACAAAATTCTTCTGTTTAGAATTTATAACAAAATAGGACAATGTACCAAAATTTGATAATATTATTATCCAC AA	2250
TAAAGAATATCTGCATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2287

**Abb. 21: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Palinurus elephas* Hc2**

Abgebildet ist die komplette Nukleotidsequenz des *Palinurus* Hämocyanins Hc2, sowie die Translation in Aminosäuren.

Signalpepetid : gelb unterlegt

Stopcodon : Rot unterlegt.

Polyadenylierungssignal : liegt 19 bp vor dem PolyA<sup>+</sup>-Schwanz und ist violett unterlegt.

Die Histidine, die mit den Kupferionen der Kupferbindungsstelle koordiniert sind, sind blau unterlegt.

PeIHc3

AGAGTCTGGTCTTGTGCGCGCTAGTGGCCACAGCTGCCGCTTGGCCAAGCTTCAGCGGTGAACCTACTAACGGTTTCCAAAGTGACG 90  
K V L V L C A L V A T A A A W P S F S G E L T N G F Q S D V 30  
TCCACTCATCCGATAACGCCATAAACAACAGGATGTCAACCATCTGCTGGACAAGATCTACGAGCCATAAAAGATGAGAACTGCACA 180  
H S S D N A H K Q Q D V N H L L D K I Y E P I K D E K L H N 60  
ACACAGCACAAACCTTTGACCTGTGGCCGACACCTCCATATATGGTGACGATGGTGCAGCCGCCAAAACGCTTATGCAGGAGCTTAACG 270  
T A Q T F D P V A D T S I Y G D D G A A A K T L M Q E L N D 90  
ATCATAGACTGTTGGAACAGCATCATTTGGTTCTCACTTTTTAACACTCGCCAGAGGAAGAAGCACTCATGCTTTTTACTGTCTGAATC 360  
H R L L E Q H H W F S L F N T R Q R E E A L M L F T V L N Q 120  
AGTGAAGGATTGGAACGTTTCTTAATAACGCCGCTTCTTTCGTGAGAGGATGAATGAGGGAGAGTTTGTGTATGCACTCTATGTGA 450  
C K D W N C F L N N A A F F R E R M N E G E F V Y A L Y V S 150  
GTGTCATCCACTCTAAACTGGGAGATGGTATTTGTTCTGCCTCCACTCTACGAAGTCACCCCTCACATGTTTACAACAATGAAGTCATCG 540  
V I H S K L G D G I V L P P L Y E V T P H M F T N N E V I D 180  
ACAAGGCTTACTCCGCCAAGATGACCCACAAAGAAGGTACATTTAACATGAGCTTCACAGGAACATAAAGAACAAGAACAACGAGTGG 630  
K A Y S A K M T H K E G T F N M S F T G T K K N K E Q R V A 210  
CCTACTTCGGGGAAGATATTGGCATGAACATCCACCAGTTACTTGGCATATGGACTTCCCTTCTGTTGGGACGACTCCTATGTTTATC 720  
Y F G E D I G M N I H H V T W H M D F P F W W D D S Y G Y H 240  
ATCTGGATCGCAAGGTGAGCTCTTCTTCTGGGTCCACCACCAGCTCACTGCCGCTTTGACGCAGAACGTCTCTCCAAGTGGTGGATC 810  
L D R K G E L F F W V H H Q L T A R F D A E R L S N W L D P 270  
CCGTGCGCAACTACATTGGGTGGACGTTATCCACGAGGATTGCTCCACAGCTAGTTACAAGCATGGTGGTAGTTCCCTACACGTC 900  
V A E L H W V D V I H E G F A P H A S Y K H G G E F P T R P 300  
CAGACAACATCCGTTTCAAATAAGTGGACGGCTAGCTCGTGTGCATGACATGGAATCACAGAGCCGCATTCTGTGACGCAATTGCTC 990  
D N I R F K N V D G V A R V H D M E I T E S R I R D A I A H 330  
ACGGTTACATCAGGCCACCGATGGACACACAATCGACATCAGGCAACCTAATGGCATCGAACTCCTGGGAGACATCATCGAATCCTCCA 1080  
G Y I T A T D G H T I D I R Q P N G I E L L G D I I E S S M 360  
TGTACAGTTCTAACCCACACTATTATGGTCCCTACACAACACTGCTCACATGATGCTTGGTCGACAGGGTGTCTCATGGCAAGTTCA 1170  
Y S S N P H Y Y G S L H N T A H M M L G R Q G D P H G K F N 390  
ACATGCCCTCCCGGTATTATGGAGCATTGAGACTGCCACACGCGACCCAAAGTTTCTTCAGACTGCACAAATATATGGaCAACATCTTCA 1260  
M P P G V M E H F E T A T R D P S F F R L H K Y M D N I F K 420  
AGGAACACACAGACTCTTCCCTCCCTACCCATGAAGACTCGAATTCGCCGTTTTCAGTGGACAATATTGCTATTGATGGACACC 1350  
E H T D S F P P Y T H E D L E F A G V S V D N I A I D G H L 450  
TTACTACATTCTTCGATCAGTTCAAATACAGTCTTGTAATGCTGTGGATTGAGTGAAGAAACGTAGAGGATGTGGCAATCTATGCCAATG 1440  
T T F F D Q F K Y S L V N A V D S G E N V E D V A I Y A N V 480  
TTCATCGCCTTAACCATGAAGAATTTACTTATGATATTGAGTGCAGGAACCAACGAAGAAGAGAAATTTGCTACCGTCCGCATTTTCT 1530  
H R L N H E E F T Y D I E V R N H N E E E K F A T V R I F L 510  
TGTGCCCTACCGAGGATAATAATGGCATAACCTTGAACCTTAGATGAAGCACGTTGGCTTTGCCTTGAAATGGACAAGTCTGGAAAAAC 1620  
C P T E D N N G I T L N L D E A R W L C L E M D K F W K K L 540  
TGGCAACGGACTTAATATGATAGAACGAGTCTTAAGGACTCGTCGGTGACCGTCCCTGATATGCCAAGCTTTGAATCGTGAAGCACC 1710  
G N G L N M I E R S S K D S S V T V P D M P S F E S L K H Q 570  
AAGCTGATGAAGCGGTAAGAACGGAGAAGACCTGGACCTGAGTGCATGAACGGTCTTGTGGCATCCCCGACAGAATGCTGCTACCCA 1800  
A D E A V K N G E D L D L S A Y E R S C G I P D R M L L P K 600  
AGAGCAAGCCTCAGGGTATGGAATTC AACCTATACTGGCTGTGACTGACGGTGACAAGGATACAGATGGAAGTGTGAGACCAGGATC 1890  
S K P Q G M E F N L Y V A V T D G D K D T D G S D G D H D H 630

```

ATCACGGCACCCACGCTCAGTGTGGCATTACCGGTGAACAGTATCCAGACCACCGGCCTTTGGGTTATCCACTGGAACGTCGCATTCCTG 1980
  H G T H A Q C G I H G E Q Y P D H R P L G Y P L E R R I P D 660
ATGAACGCGTCTTTGATGGCGTTTCAAACATCAAGCACGCACTCGTCAAGATCGTCCATGACCCAGAGCTTCGTGCT TGA GTTTCCTTCT 2070
  E R V F D G V S N I K H A L V K I V H D P E L R A * V S F S 690
CATAGTATGATCAAAATTATGACTTTGATCTGTTTATGGATCATTTTAGTAAACATCAGAATGTTTCGTGTGTTCAATAACTT TAGTATAG 2160
TCTCAACAAAATTCTTCTGTTTAGAATTTATATCAAAATAGGACAATGTACCAAAATTTGATAATATTATTATCCCA CATAAAGAATAT 2250
CTGCATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2275

```

**Abb. 22: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Palinurus elephas* Hc3**

Abgebildet ist die komplette Nukleotidsequenz des *Palinurus* Hämocyanins Hc3, sowie die Translation in Aminosäuren.

Signalpepetid : gelb unterlegt

Startcodon : unvollständig, teilweise markiert.

Stopcodon : Rot unterlegt.

Die potentielle Glykosilierungsstelle ist mit blauen Buchstaben markiert (NMS).

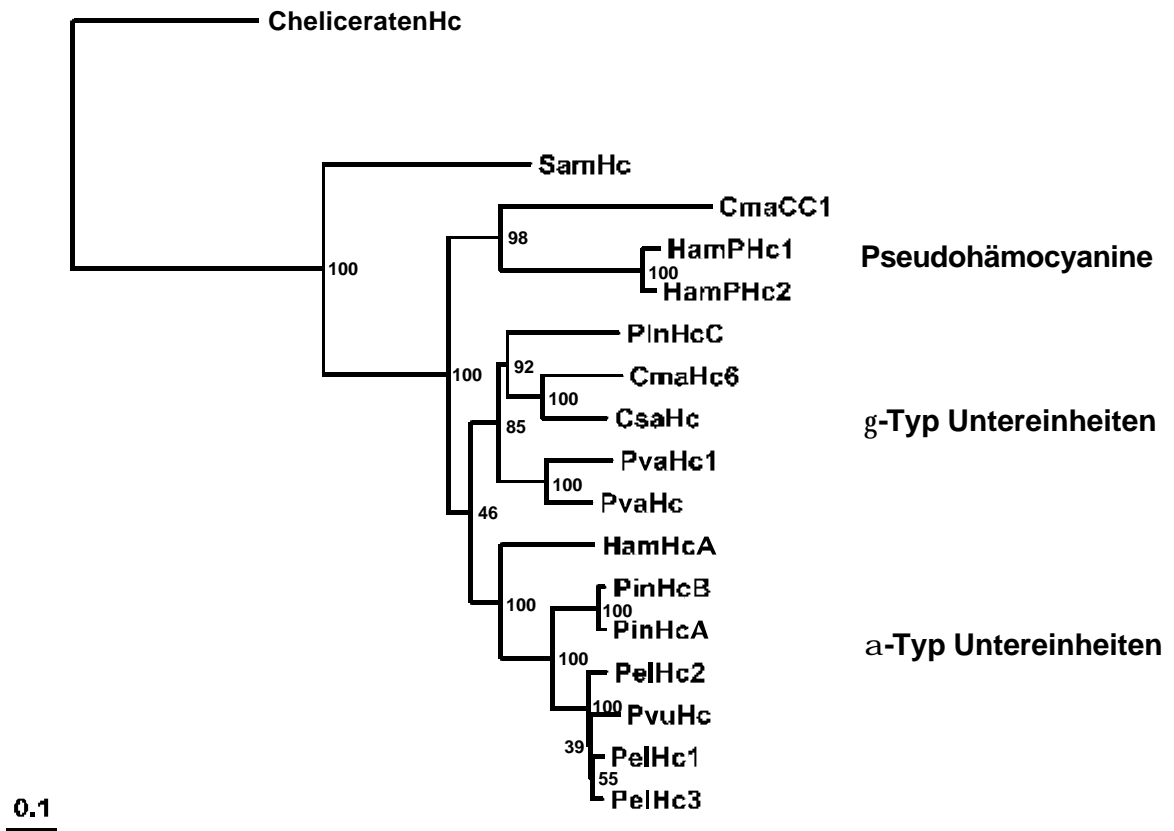
Polyadenylierungssignal : liegt 19 bp vor dem PolyA<sup>+</sup>-Schwanz und ist violett unterlegt.

Die Histidine, die mit den Kupferionen der Kupferbindungsstelle koordiniert sind, sind blau unterlegt.



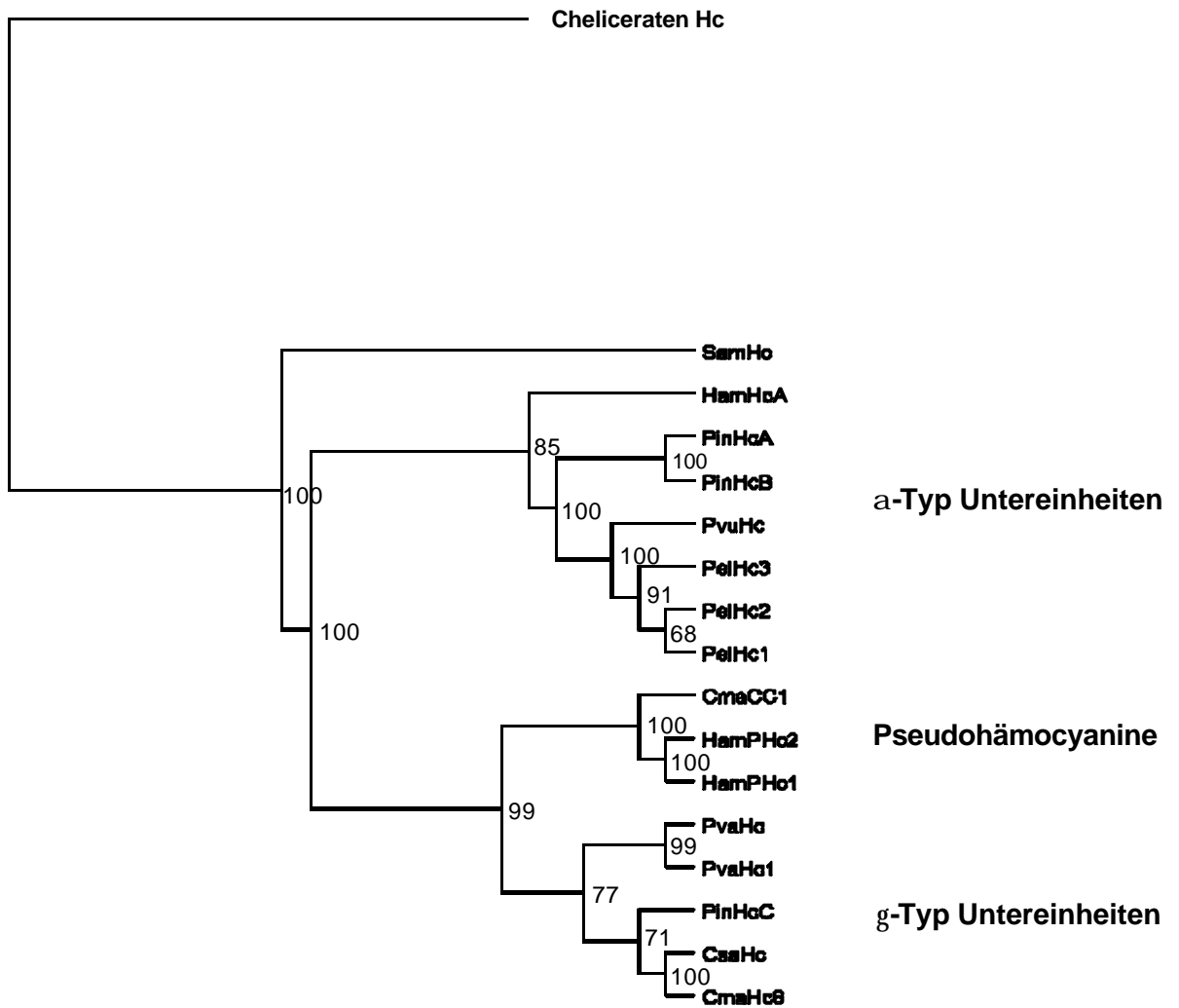
### 1.3 Phylogenetische Auswertung der Hämocyaninsequenzen von Crustaceen

Um die Evolution der Hämocyanine der Crustacea zu untersuchen, führte ich im Rahmen meiner Arbeit eine Stammbaumanalyse mit den Hämocyaninsequenzdaten durch. Dazu wurde von allen verfügbaren Hämocyanin- und Pseudohämocyaninsequenzen von Crustaceen ein Mehrfachalignment erstellt und ausgewertet. Die Stammbaumanalyse der Hämocyaninsequenzdaten erfolgte mit dem „Neighbor-Joining“-Verfahren auf der Basis der empirischen Proteindistanzen (PAM001 Matrix) nach Dayhoff. Eine „Maximum Parsimony“-Analyse wurde mit dem PROTPARS-Programm wie in Abschnitt B 16 durchgeführt. Die statistische Absicherung des ermittelten Stammbaums erfolgte mit der Bootstrapping-Methode. Als Außengruppe, d.h. der phylogenetische älteste Ast des Stammbaums, wurden die Hämocyanine der Cheliceraten gewählt (zur Wahl der richtigen Außengruppe siehe Burmester, 2001). Die Pseudohämocyanine und Hämocyanine der Crustaceen bilden bei beiden verwendeten Methoden zwei unterschiedliche Äste, wobei die Hämocyanine nochmals in die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Typ-Sequenzen gesplittet werden. Diese beiden unabhängigen Äste repräsentieren die beiden unterschiedlichen Untereinheitstypen der Crustaceen Hämocyanine (Abb. 23 und 24). Die statistische Absicherung der beiden Bäume ist aufgrund der hohen „Bootstrapwerte“ sehr gut. So ist das Schwestergruppenverhältnis des Insektenhämocyanins mit den Crustaceenhämocyaninen zu 100% gesichert. Ebenfalls die Gruppierung der Pseudohämocyanine scheint strikt zu sein (98 resp. 99). Die Auftrennung der beiden Untereinheitstypen in zwei unabhängige Äste ist mit 46% mit der „Neighbor Joining“ Methode ein wenig schwach, jedoch bei dem „Maximum Parsimony“ Verfahren mit 99% ( $\gamma$ -Typ) und 85% ( $\alpha$ -Typ) gut unterstützt.



**Abb. 23: Molekulare Phylogenie der Hämocyanin Untereinheiten der Crustacea**

Ein Multisequenzalignment mit Proteinsequenzen von Hämocyanin und Pseudohämocyanin verschiedener Arthropoden wurde mit der „neighbor-joining“-Methode analysiert. Der Balken entspricht einer 0,1 PAM Distanz. Zur statistischen Absicherung des Stammbaums wurden die Bootstrapwerte berechnet. Sie sind als Zahlen an den Aufspaltungspunkten angegeben. SamHc, *Schistocerca americana* Hämocyanin; CmaCC1, *Cancer magister* Cryptocyanin 1; HamPHc1 und 2, *Homarus americanus* Pseudohämocyanin 1 und 2; PinHcA, B und C, *Panulirus interruptus* Hämocyanin C; CmaHc6, *Cancer magister* Hämocyanin 6; CsaHc, *Callinectes sapidus* Hämocyanin; PvaHc und Hc1, *Pennaeus vanamei* Hämocyanin; HamHcA, *Homarus americanus* Hämocyanin A; PelHc1-3, *Palinurus elephas* Hämocyanin; PvuHc, *Palinurus vulgaris* Hämocyanin.



**Abb. 24: Molekulare Phylogenie der Hämocyanin Untereinheiten der Crustacea**

Ein Multisequenzalignment mit Proteinsequenzen von Hämocyanin und Pseudohämocyanin verschiedener Arthropoden wurde mit der „maximum parsimony“-Methode analysiert. Der Balken entspricht einer 0,1 PAM Distanz. Zur statistischen Absicherung des Stammbaums wurden die Bootstrapwerte berechnet. Sie sind als Zahlen an den Aufspaltungspunkten angegeben. SamHc, *Schistocerca americana* Hämocyanin; CmaCC1, *Cancer magister* Cryptocyanin 1; HamPHc1 und 2, *Homarus americanus* Pseudohämocyanin 1 und 2; PinHcA, B und C, *Panulirus interruptus* Hämocyanin C; CmaHc6, *Cancer magister* Hämocyanin 6; CsaHc, *Callinectes sapidus* Hämocyanin; PvaHc und Hc1, *Pennaeus vanamei* Hämocyanin; HamHcA, *Homarus americanus* Hämocyanin A; PelHc1-3, *Palinurus elephas* Hämocyanin; PvuHc, *Palinurus vulgaris* Hämocyanin.

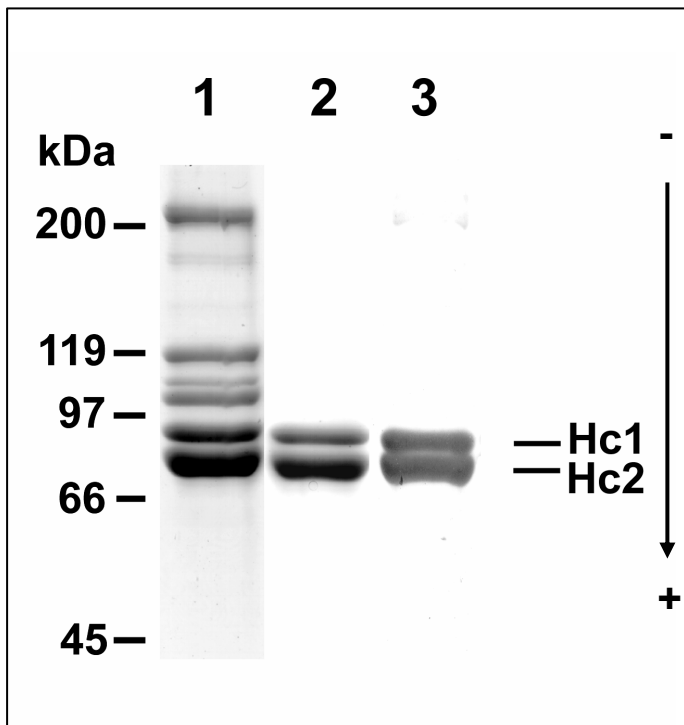
## 2. Die Hämocyanine der Myriapoden

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit sollte die erstmalige molekulare Charakterisierung des Hämocyanins der Myriapoda sein. Dazu wurden Vertreter von *Spirostreptus spec.*, *Archispirostreptus gigas* und *Teledinopus aoutii* näher untersucht. Zu weiterführenden biochemischen Untersuchungen wurde das Hämocyanin der *Spirostreptus*-Art herangezogen.

### 2.1 Biochemische Charakterisierung des Hämocyanins von *Spirostreptus spec.*

Zu Beginn meiner Arbeit lagen schon umfangreiche biochemische Untersuchungen mit dem Hämocyanin des Diplopoden *Spirostreptus*, sowie Daten zu den Sauerstoffbindungseigenschaften vor (Jaenicke *et al.*, 1999). Bei dem Hämocyanin von *Spirostreptus* handelt es sich um ein 6x6 Molekül, das in großen Mengen in der Hämolymphe vorliegt (ca. 50 bis 70 mg/ml). Es besteht aus mindestens zwei gelelektrophoretisch und immunologisch unterschiedlichen Untereinheiten, die in einem Konzentrationsverhältnis von etwa 1:3 vorliegen.

Ich untersuchte zunächst das Hämocyanin des Diplopoden *Spirostreptus* biochemisch, um einen vorhandenen Antikörper zu testen und konnte es daraufhin molekularbiologisch charakterisieren. Die Hämolympheproteine wurden aufgrund ihrer Größe durch eine Gelfiltrations- Chromatographie gereinigt. Antikörper gegen das aufgereinigte Hämocyanin konnten in Meerschweinchen hergestellt werden (Jaenicke *et al.*, 1999). In einer SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass das Hämocyanin von *Spirostreptus* zwei verschiedene, elektrophoretisch trennbare Untereinheiten besitzt. Diese wurden mit SpiHc1 und SpiHc2 bezeichnet (Abb. 25). In einem Westernblot wurden diese Untereinheiten mit verschiedenen Antikörpern gegen Crustaceen- oder Cheliceratenhämocyanine und mit dem spezifischen anti-*Spirostreptus*-Hämocyanin-Antikörper nachgewiesen (Abb. 25).



**Abb 25: SDS-PAGE und Westernblot von *Spirostreptus*-Hämocyanin**

Proteine der Gesamthämolymphe (Spur 2) und isoliertes Hämocyanin wurden in einer SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt.

(3) Westernblot der Gesamthämolymphe mit einem spezifischen anti-*Spirostreptus*-Hämocyanin Antikörper. Die beiden Hämocyanin-Untereinheiten sind mit Hc1 und Hc2 bezeichnet.

### 2.1.2 N-terminale Sequenzen des Hämocyanins von *Spirostreptus*

Die N-terminalen Sequenzen der beiden Untereinheiten wurden wie oben bereits beschreiben von Dr. Pötsch (Institut für Physiologische Chemie, Mainz) ermittelt. Obwohl die Aminosäuresequenzen nicht gut lesbar waren, konnten die beiden Banden als unterschiedlich identifiziert werden. Eine erkennbare Übereinstimmung mit den damals bekannten Hämocyanin Sequenzen wurde jedoch nicht gefunden. Die obere Bande im Gel konnte jedoch vermutlich SpiHc1 zugeordnet werden EKXP(K/L)PVNV(E/G), während es sich bei der unteren Bande dementsprechend um SpiHc2 handelt : (H/A)EXP(H/A)PTEDLL

### 2.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung des Hämocyanins von *Spirostreptus*

Da der Expressionsort des Hämocyanins bei *Spirostreptus* unbekannt ist, extrahierte ich zuerst die Gesamt-RNA (ohne Cuticula) eines kompletten Tieres und isolierte mit dem PolyATract Kit (Promega) die Poly(A)<sup>+</sup>-RNA. Für die Synthese der ZAP Express cDNA-Bank wurden etwa 5 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA eingesetzt. Die cDNA-Bank hatte einen Primärtiter von etwa 300 000 pfu/ml, der auf einen Endtiter von  $2.8 \times 10^8$  pfu/ml amplifiziert werden konnte.

Die Bank wurde mit dem anti-*Spirostreptus*-Hämocyanin Antikörper durchsucht und es konnten 37 mal leicht unterschiedliche, etwa 500 bp große Klone identifiziert werden, die am 5'-Ende nicht vollständig waren und sich in nur wenigen Basenpaaren am Ende unterschieden. Auch ein Sondenscreening mit einer spezifischen DNA-Sonde ergab keine positiven Klone. Erst durch eine RT-PCR konnte eine Hämocyaninsequenz aus dem mittleren Bereich amplifiziert werden. Durch ein anschließendes 5'-RACE mit einem Set von mehreren spezifischen Oligonukleotiden und einem degenerierten Primer der CuA-Bindungsstelle war es möglich, die komplette Sequenz zu amplifizieren. Die ermittelte Sequenz ist 2082 bp lang (plus ein PolyA-Schwanz von 18 bp) und beinhaltet einen offenen Leserahmen von 1959 bp. Das Polyadenylierungssignal AATAAA liegt 21 bp upstream des PolyA-Schwanzes (Abb. 26). Eine Translation ergibt ein Protein von 636 Aminosäuren mit einer errechneten Molekülmasse von 73,7 kDa. Vergleicht man diese Sequenz mit den Ergebnissen der N-terminalen Sequenzierung, so kann man sie dem Hc1 zuordnen. Mit einem Signalpeptid von 17 Aminosäuren umfaßt die native Hämocyaninuntereinheit 636 Aminosäuren und hat eine errechnete Molekülmasse von 73.7 kDa, was mit den Daten der biochemischen Analyse sehr gut überein stimmt. Auch die sechs Kupfer-

koordinierten Histidine, die bei allen Arthropodenhämocyaninen absolut konserviert vorliegen, sind bei *Spirostreptus* vorhanden.

Die Sequenz des Hämocyanins von *Spirostreptus* ist in der EMBL/Genbank unter der Accession-Nummer AJ 297738 verfügbar.

## SpiHc1

```

AGTTAAGAATCAGCGCTTCCGAAGACGGTCTTGGGCTGAATTATTCAATTTTATCCATTA AAA 65
ATCAAACCTTTTCATTTTAGCCGTGGTCTACTGGCCACCACGGCAATCGCAGAAAAAGTGCCCAAGCCGGTAAATGTAGAAGCCAAACAG 155
M K L F I L A V V L L A T T A I A E K C P K P V N V E A K Q 30
AAAATGGTGGACACTCTCATCAGTTACATTAACAAACCCGCCAATCCCGTTCTCCAAAGCCACCAATAGATCCAAAGAAATTAATAGGC 245
K M V D T L I S Y I N K P A N P V P P K P P I D P K K L I G 60
ATTGGAATTTTGCCGAAAGATCAAGTTTCTCATTCTTTGACGAAAGGACGTGGGATGAAGTCAGTGAGGTCTGAAAAGATTTATGGCG 335
I G I L P K D Q V F S L F D E R T W D E V S E V L K R F M A 90
GCACCAACTTTTGAAGACTTCATTAAGTTGCCGAAACGTTGTACCCTCACGTGAATGAGGACTTGTTCCTGTTCCGGACTCTCCGTGGCC 425
A P T F E D F I K V A E T L Y P H V N E D L F L F G L S V A 120
ATTGTCCATCGTCCAGATGCCAACGGTGTCCACGTACCTAGAGTACACGAGTTTATCCGGACAAATTCTTGACCAACGACGTCTCTCATC 515
I V H R P D A N G V H V P R V H E V Y P D K F L T N D V L I 150
AACATTCGAAAACAAATCATTAAGGACACAAGAACCCCGTGGTGAAGGACACCCACTATTACCACAATGACTTCGACCCATTCCTGAGA 605
N I R K Q I I K G H K N P V V K D T H Y Y H N D F D P F R R 180
GTGGATTACTTCACCGAAGATCTTGGCATGAATTCGCACCATTATCACTGGCAGGTGTTGCACCCATCCATCTGGACACAAGATATTGGA 695
V D Y F T E D L G M N S H H Y H W H V L H P S I W T Q D I G 210
GAAAAATCCAAACTGGAGAATCTTACTGGATGCACCGACAAATGGTTGCCAGATTTGACAGTGAGCTTTTGTGAGTCCATCTCTCT 785
E K S K L G E L F Y W M H R Q M V A R F D S E L L S V H L P 240
AGAATTTCTTCCCTCGATGACTGGAACAAGAAAGTCAAGATCGGTTATGCCCTCACTTGACCATCCAAAGAACGGGTTACACCTACATG 875
R I S S L D D W N K K V K I G Y A P H L T I Q R T G Y T Y M 270
AACCGCCAGAGAACCTCGAGATTGAAGATTCGCCTGAAGTACCAAGGGCGAGCTGATGCAGTGAAGAACAGGATCATGGAGGCTATT 965
N R P E N L E I E D L P E L T K G E L M Q W K N R I M E A I 300
GCTCGTCATAATATTACCCTAAAAGGAGGACCTGGTAAAAAATTCGCACCACTCTGAAAATGGCATAGACATTTTCGGTCACTTGATC 1055
A R H N I T L K G G P G K K L R T T P E N G I D I F G H L I 330
GCAGCCACGAAGAACAGCACCAATCGCCGATACTATGGCAATCTACATTCTATGCCACGTCATTGCAGCTAGAATCGCAGATTCAGAC 1145
A A T K N S T N R R Y Y G N L H S Y A H V I A A R I A D S D 360
GGCGAACATATGGAGGACAATGGTGCATGTACGACGTGGCCACTTCTGCCGAGATCCTCTGTTTTACAGCTGGCACAAGTTTCATCGAC 1235
G E H M E D N G A M Y D V A T S A R D P L F Y S W H K F I D 390
AAGCTTTTCACCGAATACCAGATGACCCCTGACGCCATACACTCTTACCAGTTGACATGGCCAGATGTTGTTGTCGATGGTATCCACATT 1325
K L F T E Y Q M T L T P Y T P Y Q L T W P D V V V D G I H I 420
GAAAACCTGAAAACCCATGAAGAAAATATGATTCACACCTATTACACCAGCAGCACTCTGAGGCTCAGCAAAGGCTTCGATTACACCAAG 1415
E N L K T H E E N M I H T Y Y T S S T L R L S K G F D Y T K 450
GACAGTGAGGCCAAGGTCATCGTAGAACACACCGATCACGACGATTTCTGTTTACGTCATCGATATCGACAACAATGCCGAGTGGAGAAG 1505
D S E A K V I V E H T D H D D F V Y V I D I D N N A R V E K 480
ACGGCCGTTCTGAGAATATTCTTGGCACCCAAATACGACGAGCGTGGTTCATCTTTGACACTGAAAGAACAGCGAGTTCATGATGATCGAA 1595
T A V L R I F L A P K Y D E R G H P L T L K E Q R V M M I E 510

```

```

CTGGACAAATTTAAGGCCACATTGAAACCTGGTCATAACGTTGTCCGTGCTGCTCAAACGAATCCAGCGTCACCATGCCTGTTGACCAC 1685
L D K F K A T L K P G H N V V R R C S N E S S V T M P V D H 540
ATCTACGGTGATATCACAAGAACTGTCGATGAGGACCATTGCCATTGTGGCTGGCCAGAGTACCTCTTGGTTCCACAGGGTGATTATGAT 1775
I Y G D I T R T V D E D H C H C G W P E Y L L V P Q G D Y D 570
GGAATGCACTACGAACTTTTCGTGATGGCCACCAACTACGATGAAGACAAGGCTCAAGACCCGACCTGTCTGCAAAATGCCACGCTCAC 1865
G M H Y E L F V M A T N Y D E D K A Q D T D L S C K C H A H 600
AGCTACTGCGCAACATTTTAGGAGAGTACCTAGACAAAAGGCCACTCGGATATCCATTGACAGAAAGATCAAAGCCACAGGCTGGGCA 1955
S Y C G N I L G E Y L D K R P L G Y P F D R K I K A T G W A 630
GAATTCAAGACCCAGAACATGTGCGACGCTGACATCGTCATCAAATTTTCTGGAAAAACAAGGACCATTAAACGTTTACCAGAGATG 2045
E F K T Q N M C D A D I V I K F S G K N K D H * 653
ATTGTTGATTGTTTAAATAAATAAATAATGTGCATCTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2100

```

**Abb. 26: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Spirostreptus* Hc1**

Abgebildet ist die komplette Nukleotidsequenz des Spirostreptus Hämocyanins Hc1, sowie die Translation in Aminosäuren.

Startcodon : grün unterlegt.

Stopcodon : Rot unterlegt.

Signalpeptid : gelb unterlegt.

Polyadenylierungssignal : liegt 21 bp vor dem PolyA<sup>+</sup>-Schwanz und ist violett unterlegt.

Die Histidine, die mit den Kupferionen der Kupferbindungsstelle koordiniert sind, sind blau unterlegt.

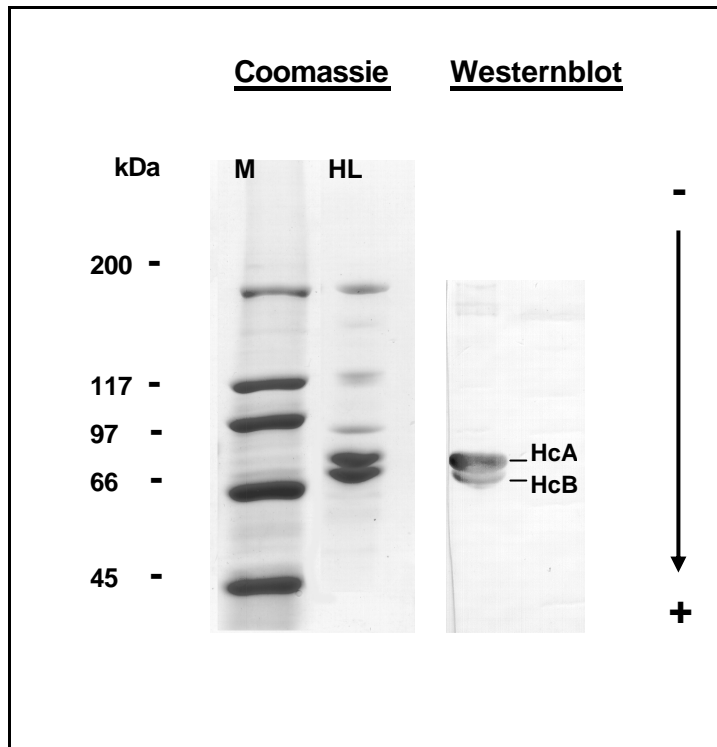
Die Aminosäuren der Proteinsequenzierung sind unterstrichen.



## 2.2 Biochemische Charakterisierung des Hämocyanins von *Scutigera coleoptrata* (Chilopoda)

Bei dem Hämocyanin des Spinnenläufers *Scutigera coleoptrata*, der zur Klasse der Chilopoden gehört, handelt es sich um ein 36mer, das aus 6 x 6 Untereinheiten aufgebaut ist (Mangum *et al.*, 1985). Gebauer und Markl (1999) identifizierten vier verschiedene Typen von Untereinheiten biochemisch und elektronenmikroskopisch. Demnach liegen die Untereinheiten (*a*, *b*, *c* und *d*) in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:2:1:1 vor und haben Molekülmassen von 75 bis 80 kDa. Dabei sollen *a* und *b* das Hexamer bilden und *c* oder *d* wird eine „linker“-Funktion zugeschrieben. Auch in immunologischen Untersuchungen konnten diese vier verschiedenen Untereinheitstypen identifiziert werden (Gebauer und Markl, 1999).

Die Hämolympheproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Hämocyaninbande aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelfragmente wurden homogenisiert und zur Herstellung von polyklonalen Antikörper verwendet (Fa. Charles River). Das Antiserum wurde mittels Westernblot getestet. In einer SDS-PAGE mit 7,5% Polyacrylamid konnten zwei diskrete Banden mit einer Molekülmasse von jeweils etwa 75 kDa identifiziert werden. Auch in einem Western Blot detektierte der anti-*Scutigera*-Hämocyanin Antikörper diese Banden (Abb. 27). Man kann davon ausgehen, dass die Untereinheiten *c* und *d* in der langsameren, die Untereinheiten *a* und *b* in der schnelleren Bande comigrieren und deshalb nicht getrennt zu sehen sind (Gebauer und Markl, 1999).



**Abb 27: SDS-PAGE und Westernblot mit Hämocyanin von *Scutigera coleoptrata***

Das gereinigte Hämocyanin von *Scutigera coleoptrata* wurde in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt. Man erkennt mindestens zwei distinkte Banden im Bereich von 75 kDa. Diese Banden konnten in einem Westernblot mit einem anti-*Scutigera*-Hämocyanin-Antikörper nachgewiesen werden.

### 2.2.2 N-terminale Sequenzen des Hämocyanins von *Scutigera coleoptrata*

Auch bei *Scutigera coleoptrata* wurden die N-terminalen Sequenzen wie oben beschrieben von H. Heid (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) ermittelt. Die Proteinsequenz HcA stimmt bis auf zwei Aminosäuren mit SpiHc1 überein (DQEPAVPADTKDKLEKIL), während HcB (DKEPXATD(K, Q oder I)EAKQKXMLLE) auf cDNA Ebene nicht ermittelt werden konnte.

### 2.2.3 Molekularbiologische Charakterisierung zweier Hämocyanin-Untereinheiten von *Scutigera coleoptrata*

Die cDNA-Bank wurde aus der RNA von zwei kompletten Tieren hergestellt. Dazu wurde die mRNA isoliert und davon etwa 3-5 µg für die Erststrangsynthese eingesetzt. Die Primärbank hatte einen überdurchschnittlich hohen Titer von  $1.3 \times 10^6$  pfu/ml, der auf ca. 50 000 pfu/ml/Platte amplifiziert wurde. Die fertige cDNA-Bank hatte einen Titer von ca.  $3 \times 10^8$  pfu/ml. Durch ein Antikörperscreening mit dem anti-*Scutigera*-Hämocyanin-Antikörper konnten etwa 10 positive Klone isoliert und mittels *in vivo*-Excision rezirkularisiert werden. Anschließend wurden die Plasmide präpariert und konnten ansequenziert werden. Eine der Untereinheiten lag als vollständiger cDNA-Klon (ScoHc1) vor und konnte mit den Vektorprimern T3 und T7 von beiden Enden her sequenziert werden und danach mittels „primer walking“ mit spezifischen internen Primern komplett durchsequenziert werden. Ein weiterer Klon (ScoHc2), der sich als zweite Untereinheit identifizieren ließ, war am 5'-Ende unvollständig. Die fehlenden 500 bp konnten jedoch mittels PCR aus der cDNA-Bank mit einem Promotorprimer (T3) und zwei spezifischen *nested* Primern amplifiziert und anschließend in den Klonierungsvektor PCR II TOPO TA kloniert werden. Dadurch war auch die zweite Untereinheit von *Scutigera* inklusive Signalpeptid vollständig sequenziert (Abb 28 und 29). Eine der beiden Hämocyaninuntereinheiten konnte durch einen Sequenzvergleich der HcA-Bande der Proteinsequenzierung zugeordnet werden (siehe Abb. 28). Die beiden unterschiedlichen Untereinheiten wurden in Übereinstimmung mit den biochemischen Daten mit ScoHc1 und ScoHc2 bezeichnet wurden. Es handelt sich um Proteine mit 636 (ScoHc1) und 648 (ScoHc2) Aminosäuren und einer errechneten Molekülmasse von 74,4 kDa bzw. 74,8 kDa. Die beiden Sequenzen sind in der EMBL/Genbank unter den Accession-Nummern AJ 344359 und AJ 344360 verfügbar.

**ScoHc 1**

	GGGGACGTGGCGATATA	17
<b>ATG</b>	TGGTCATTGGCTTTAGCGACTCTTCGTGCTAGGCACGGTTATCCGTGCTGATCAGTGCCACCAGTACCTGCAGATACCAAGGAC	107
M W S L A L A T L F V L G T V I R A	<u>D Q C P P V P A D T K D</u>	30
AAATTGGAGAAGATTTTGAATGATTGGTCATGTCAACAGACCCTTAACGCCAGAGACACCCGAACCCGCTGGTTATGATGAAACCAAG		197
<u>K L E K I L E L I G H V N R P L T P E T P E P A G Y D E T K</u>		60
CTGAAAGGCCTTGGTATTTTACCCCAACATGAGATCTTCTCTCTTCGACGAAAGAACGTGGCCCGAAGCCACCAAGGCAGCCGAATTT		287
L K G L G I L P Q H E I F S L F D E R T W P E A T K A A E F		90
CTTATGGAGGCCACTGACTTCGAACACTTCATTCAGCGTGCTGATGTTTGGAGCATCGCATCAACGAGGATATGTTTACGTACGCCCTC		377
L M E A T D F E H F I Q R A D V L R H R I N E D M F M Y A L		120
AATGTAGCCGCTCCACAGGAAGGATACTAGAGGAGTCCAGGTTCCACGTATCCACAAGATCTATCCGACAAGTTCTTGAACAAGAT		467
N V A V L H R K D T R G V Q V P R I H K I Y P D K F L K Q D		150
ATCCTTGTGAAGTAAGAGAAAAGTCAACCATGGTGAGGAGAAACCAGTTGTTGATGCCACCGAACTTCACCAGAACCAATTGGATCCT		557
I L V E V R E K V N H G E E K P V V D A T E L H Q N Q L D P		180
AACTACCGTTTGTCTTACTTCTTGAAGATATTGGTATGAATTCTCACCATACCAGTGGCAGTGTCCACCCCTGCTGCTGGTTGCCA		647
N Y R L S Y F L E D I G M N S H	<b>H</b> Y H W <b>H</b> V V H P A V W L P	210
AAACATGGACCAGGAAGGATAGAAAAGGAGAACTCTTCTACTACATGCATCACCAGATGGTGGCCAGATACGACTCTGAGCGTCTATCC		737
K H G P R K D R K G E L F Y Y M	<b>H</b> H Q M V A R Y D S E R L S	240
AACAATTTACCAAGAACTGAACCATTCGAAAACGGGATGATCCCTTGGGAAGGTTATGCTCCTCATCTTACCATCCACAAAACCGGA		827
N N L P R T E P F E N W D D P L E E G Y A P H L T I H K T G		270
TACAACTACATGTTTAGGCCTGAAGGTCTGATTGTCGCGATCTCCCTGAGTTGAACAAGAACAAGATGCGTCAATGGAAATCTCGTATC		917
Y N Y M F R P E G L I V R D L P E L N K N K M R Q W K S R I		300
CTCCACGGCATCCATCTCAACGTTCTTTATGCTGAAAACGGAACCAAGATCAGTTTGGACAATGAGCACGGTATTGACCTTCTTGGAGAT		1007
L H G I H L N V L Y A E N G T K I S L D N E H G I D L L G D		330
GCCATCGAATCCAGTCTTCTTAGTGTCAACAGAGCTTTCTACGGTAAACATCCATTGCTACGCTCACGTTATGGCCGCTCGTATTGCTGAT		1097
A I E S S L L S V N R A F Y G N I	<b>H</b> C Y A <b>H</b> V M A A R I A D	360
CCTGATGGCAGATACGGAGAAGACAATGGTGTATGCACGACGTCGCCACTTCTGCCGTGATCCTCTTTTCTACAGATGGCACAAGTTC		1187
P D G R Y G E D N G V M H D V A T S A R D P L F Y R W	<b>H</b> K F	390
ATTGATAACATCTTCCCTGAATACAAAGACAACCTCGATCCTTACACTCAGTACGAACTCACATGGCCAGATGTTGTTCTCAATGATGTG		1277
I D N I F L E Y K D N L D P Y T Q Y E L T W P D V V L N D V		420
ACTGTGAAACCACACAAGGGGATTATGACGATGAAGTCCACACTTACTGGGAAGTTGACAACACTATGAATTAGGAAAGGCTTCGATTAT		1367
T V K P H K G D Y D D E V H T Y W E V D N Y E L G K G F D Y		450
ACCAGAAAGACCACAGCCACGGTTAAAGTAAGGCATCTTCAGCATGAAGACTACCATTATGAAATTGACATTGACAATAATGCTGGCAAA		1457
T R K T T A T V K V R H L Q H E D Y H Y E I D I D N N A G K		480
GCCAAAAGGCCGTTTTCCGTATTTTCTTGGCACCTAAGTACAACGAAAAGGAGAAGTCTTCCCTGTCAACGAACAGAGGCAGTTACTC		1547
A K K A V F R I F L A P K Y N E K G E L F P V N E Q R Q L L		510
GTCGAGCTCGACAAATTCGTCGCCACTCTTGAACCTGGCCATAATGTGATTGAACCCAATCCAAGGAATCGAGCGTAACCATGTCCAAG		1637
V E L D K F V A T L E P G H N V I E R Q S K E S S V T M S K		540
GATCATGTCTTTGGAGAAATCAGAAACCTCGCCGACGACCACAGTGCAGCTGCGGCTGGCCAGATTACCTCTGCTGCCAAGGGCAAA		1727
D H V F G E I R N L A D D H Q C S C G W P D Y L L L P K G K		570
TATGAAGGCATGACCTACCAACTCTTCGTTGTTGCTACTGACTATGAAGAAGATCATGTTGAAGACGCTGGAGAAGAATGCCAGTGCCGC		1817
Y E G M T Y Q L F V V A T D Y E E D H V E D A G E E C Q C R		600

GATTCATGAGCTACTGCGGTAGTGTAGAGCACAAAGCTTCCCGACAACAAGCCTCTGGGCTACCCCTTCGACAGGAGGATAGACGGAACA	1907
D S M S Y C G S V E H K L P D N K P L G Y P F D R R I D G T	630
GGTTTCGAGGAGTTCAAGACACAGAATATGTATTACGGCGATGTGGTCATTCAGTTCACAGGTGAAACAGTGACCCAT <b>TAG</b> AAGTGATCA	1997
G F E E F K T Q N M Y Y G D V V I Q F T G E T V T H ***	657
TTGATTTGGCTAATTGTTGAAAAACAAAACCTGGACGAAA CTGTTGTTGGTGTCTCCTAAGGAAACGGGAAATGAAAGGCGGAAATGGTA	2087
TCGTAGCCATGTTTCCGTTTCCAAATCCTACTTACATCATCCATCATGAAAAAGAGATAGAAAGACCTGTGAGACACCCA CTGTGCTTTG	2177
AGGGTATCCAACAAATATGTAATGTTTTTTTGTAAAAATATTTTTTTCAGTGA <b>AAATAAA</b> AATATACTTCATTTTCTGTTGTAAAAAAAAAA	2267
AAAAAAAAAAAAAA	2280

**Abb. 28: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Scutigera Hc1***

Abgebildet ist die komplette Nukleotidsequenz des Hämocyanins von *Scutigera coleoptrata* (Hc1), sowie die Translation in Aminosäuren.

Startcodon : grün unterlegt.

Stopcodon : Rot unterlegt.

Polyadenylierungssignal : liegt 28 bp vor dem PolyA<sup>+</sup>-Schwanz und ist violett unterlegt.

Die Histidine, die mit den Kupferionen der Kupferbindungsstelle koordiniert sind, sind blau unterlegt.

Die Aminosäuren aus der Proteinsequenzierung sind unterstrichen.

**ScoHc2**

CTGGTTTTGGGTGGCAGCCTCTGAGG 28

**ATC**GACACGAGGGTTTTACGGTTAACATTGGCGTTGGTGGCGCTAAGTGGGGTCTTAGCAGATAGCGAGTCATGCAGTTCTGCTATAGTG 118

M D T R V L R L T L A L V A L S G V L A D S E S C S S A I V 30

AATGATTACAAGCTAAAACAGAAGGAAATTCAGCATCTCGTAGATACCATCAATAAGCCAGTCTACCCTGACTTCAAGGACACGAGAGGT 208

N D Y K L K Q K E I Q H L V D T I N K P V Y P D F K D T R G 60

ATTATCGATGAATCCAACATAAAAGGCTTAGGAACACTGCCCGTCTGAGGTGTTCTCGCTTTTCGACGAGAGAAACTGGGCCGAGCT 298

I I D E S K L K G L G T L P R R E V F S L F D E R N W A E A 90

GCCAAAGTCGTCGAATTGCTACTGGAACCTAAAACCTTCCGAGAGTTCATCCACTTGGCTGACATCATCCATCACAGAGTCAATGAGGAT 388

A K V V E L L L E P K T F R E F I H L A D I I H H R V N E D 120

CTGTCTTGTACGCCCTCTCCGTGGCCATCGCACACAGACCCGACTGCCAGGGAGTCCAGGTACCACGAGTACTGGATATCTACCcGAC 478

L F L Y A L S V A I A H R P D C Q G V Q V P R V L D I Y P D 150

AAATCTTTGAGAAAGGAAGTCATCCACAAGATCAAAGAAGTTTCCaACGAGGGAGCTTACTTAGATAAGGTTCCAGTTATTGATGTCTACC 568

K F L R K E V I H K I K E V S N E G A Y L D K V P V I D A T 180

GAAGTCAGCGACAACCATTTGGACCCCAACCAGGAAGTCTCTATTTCTTGAAGATTTGGGCATGAAGTCTCACCATCACCATTGGCAC 658

E V S D N H L D P N Q E L L Y F L E D L G M N S H **H** H H W **H** 210

GTGATCCACCCAGCCATTTGGCTTCCAAAACATGGTGGTGTAAAGACAGGAAGGGAGAATTGTTCTTTTACATGCACAACACAGATGGTT 748

V I H P A I W L P K H G G V K D R K G E L F F Y M **H** K Q M V 240

GCCAGATACGACACAGAAGCTTTGTCCAATGATTTGCCACGTGTGAGGCCGTCGAAAATTGGAATGATCCAATTGATGAAGTTACTCT 838

A R Y D T E R L S N D L P R V R P F E N W N D P I D E G Y S 270

CCCCATTTGATCATTGACAAGACCGGTTACAAATACGCCTACAGGCCACAAGGAGTCATCGTCCACGACCTTCCTAACTTACCAAAAACC 928

P H L I I D K T G Y K Y A Y R P Q G V I V H D L P N L P K T 300

AAAATGTTTGTAGTGAAGAACAAGATTATGGTGGTATTAGGAAGGAAGCCTCATTTTCGGCCAACAAAACCAAGTGCCTTTGAATAAC 1018

K M F E W K N R I M V G I R K G S L I S A N K T Q V P L N N 330

GACCATGGTATCGACCTTCTTGGAGACGTTTGTGAGTCCAGTCTGCTCAGTGTCAACCGTGTCTTCTATGGAATCTTCATTGTTACGCC 1108

D H G I D L L G D V V E S S L L S V N R V F Y G N L **H** C Y A 360

CACGTCATCGCGAAAGGTCACTGATCCACAGAGCACCTACGGAGAAAAGAACGGTGTATGTACGATGTAGCTACTTCAGCTCGTGAT 1198

**H** V I A G K V T D P Q S T Y G E K N G A M Y D V A T S A R D 390

CCTCTCTTTTACTCGTGGCACAAGTTCAATTGATAACATCTTCCAAGAACAAGAAACCTTACACCTTACAATAAGGATGAGCTGAAT 1288

P L F Y S W **H** K F I D N I F Q E H K E T L Q P Y N K D E L N 420

TTCCAGATGTTGAGTTGATAGTCTCCGAATCAACGTTGCTAATGGAACCTACGAGAATATTGTTCTGACTTACTGGCAGAACAGTCTG 1378

F P D V Q V D S L R I N V A N G T Y E N I V R T Y W Q N S L 450

TTCAAGATCGCCAAAGGTTCACTTTCACCACAGAGGATCCGTCTGGTTAAGGTCAAACATCTGAACCATGAGACTTCTACTACAAT 1468

F K I A K G F T F T T E G S V L V K V K H L N H E T F Y Y N 480

CTTGAAGTTACCAACAATGCCCTCGAGGAAAACATGGAGTCTGAGAAATTTTCGGTGTGTGATAAATGACGAACGCGGTCAACCATAC 1558

L E V T N N A L E E K H G V V R I F G A V I N D E R G H P Y 510

ATATTGAACGACCGCCATCTGGTCAATTGAATTGGACAAATTTACCGTCAACCTTAAGCCCGTAAGAACAGCGTCCGTCAGCCTTGC 1648

I L N D Q R H L V I E L D K F T V N L K P G K N S V R Q P C 540

TACAACtCAGCTGTaaCTGCCAAGTACGACGTGTtTACGgAGATGTAGAAAGCCAGAAGCCACAGGAAGGCTGCAACTGTGGTTGGCCA 1738

Y N S A V T A K Y D V F Y G D V E S Q K P Q E G C N C G W P 570

GACTATATGTTGCTTCCTAAGGGTAAATACGAGGGTCTCCGCTTCCGTGTGTTCGCAATTGTAACAAATCATGATGAAGATAAGGTCAGC 1828

D Y M L L P K G K Y E G L R F R V F A I V T N H D E D K V S 600

GACCAAGAGACGTGTCTGTGCGGTGATGCAGTGGCCTATTGCGGTGCTCACAAACCAGAAATACCCCGACAAGAAACCCATGGGCTTCCCC	1918
D Q E T C L C G D A V A Y C G A H N Q K Y P D K K P M G F P	630
TTCGATAGACGAATCGACGAGAGGACATTGGAACACTTCCACACCCCAACATGATTGCTACGGACGTCATAATCAAATTCACAGGAGAA	2008
F D R R I D E R T F E H F H T P N M I A T D V I I K F T G E	660
TTCCTCCACCCAAGGGTGACATC <b>TGA</b> GCGACTGAATCCAAAACGAAACTATCGAACAGTTGCATTCCTATTGTTTGTGAACTGTAGCA	2098
F L P P K G D I *	669
GTTCAAAGACTATTGTTTGATCATGACATCAGCATCATGTTTTTTAGCTTTTTTATAGGGAACATCAGCAAGTGGTTGGAAGAGCAGCG	2188
CGGGAAATGATCCATTTCCCTTCTTGTAATCTGTTGTATGTATAAAGATTGTTAACTTTT <b>ATAAAA</b> CTGCACTTTAAATAAAAAAA	2278
AAAAAAAAAA	2288

### Abb. 29: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Scutigera Hc2*

Abgebildet ist die komplette Nukleotidsequenz des Hämocyanins von *Scutigera coleoptrata* (Hc2), sowie die Translation in Aminosäuren.

Startcodon : grün unterlegt.

Stopcodon : Rot unterlegt.

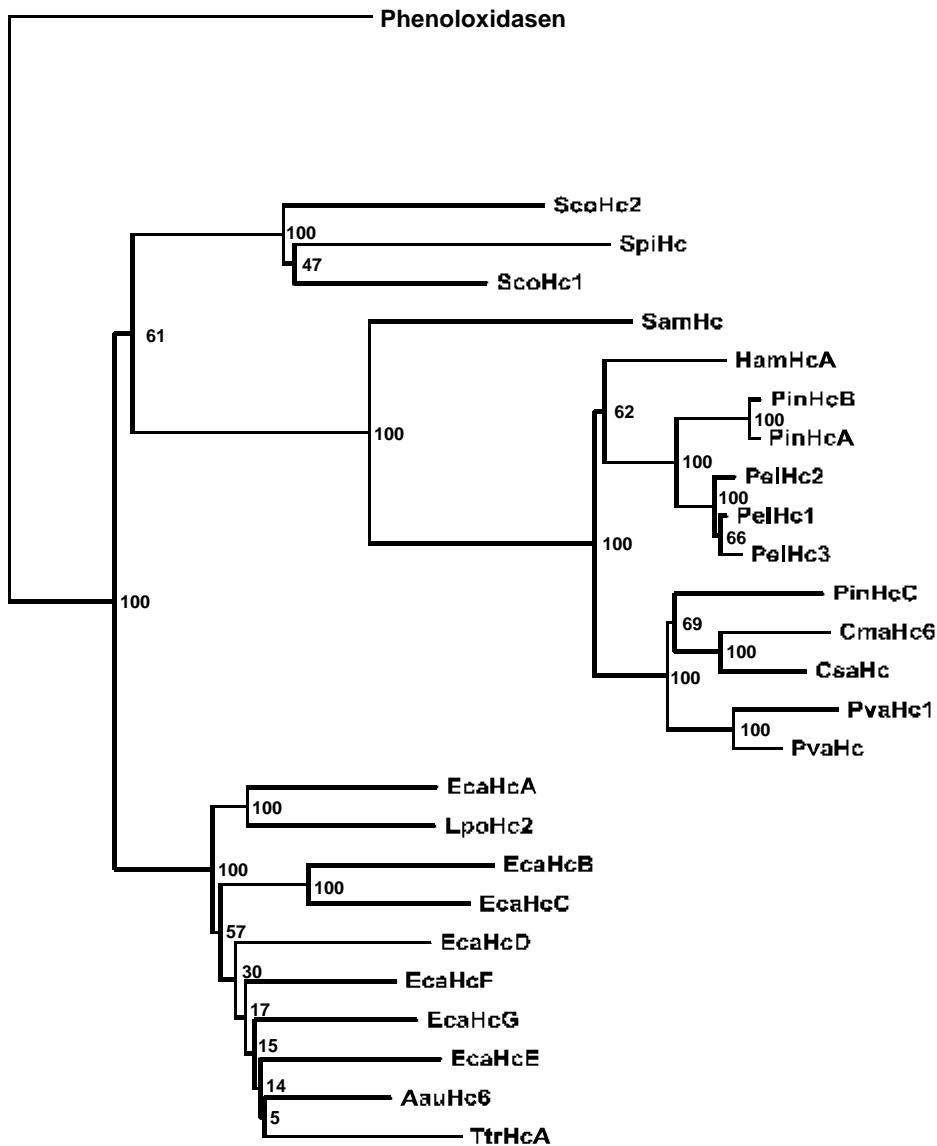
Polyadenylierungssignal : liegt 19 bp vor dem PolyA<sup>+</sup>-Schwanz und ist violett unterlegt.

Die Histidine, die mit den Kupferionen der Kupferbindungsstelle koordiniert sind, sind blau unterlegt.

### 2.3 Phylogenetische Auswertung der Hämocyaninsequenzen von Myriapoden

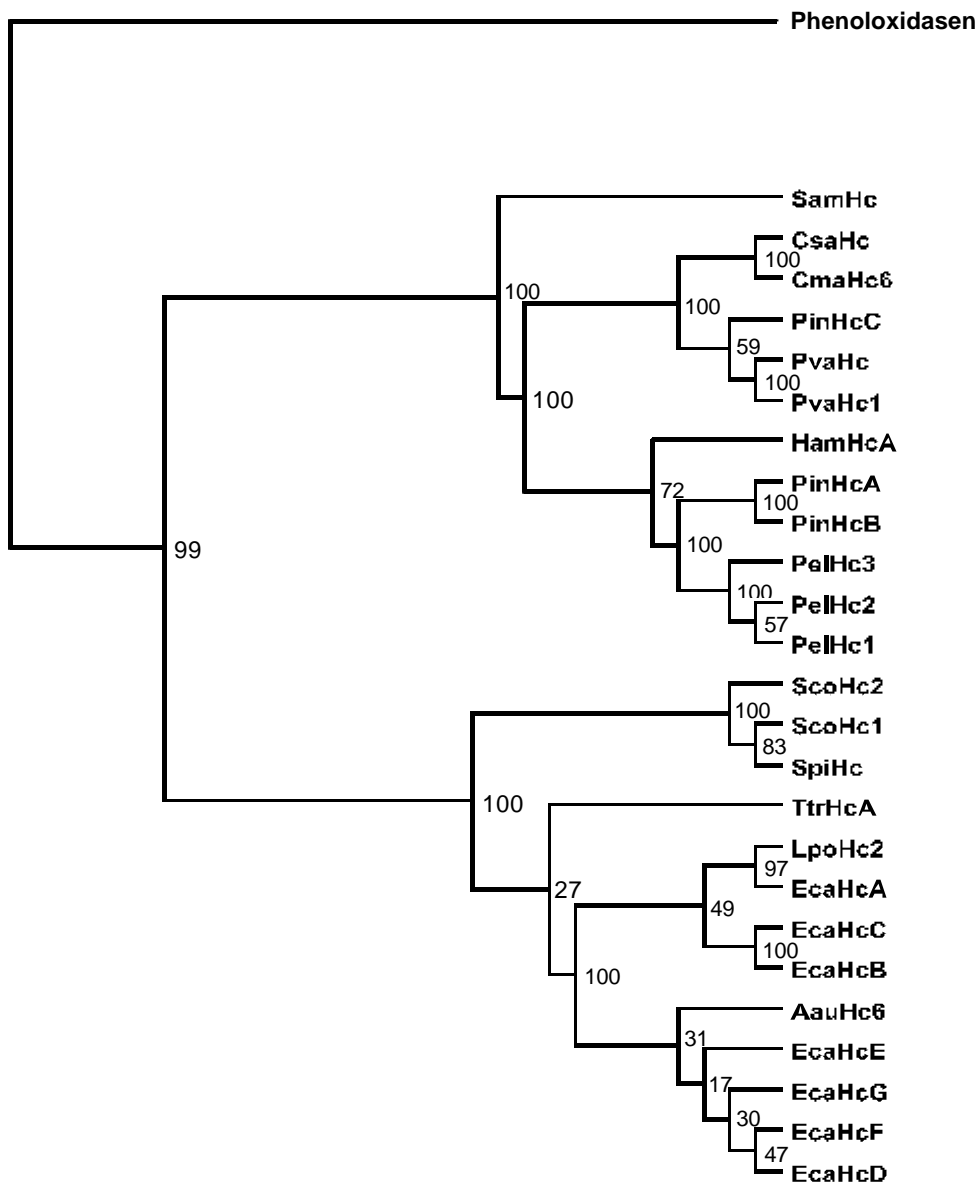
Mit den Hämocyaninsequenzen von *Spirostreptus spec.* (SpiHc1), *Scutigera coleoptrata* (ScoHc1 und ScoHc2) und Hämocyaninsequenzen von Cheliceraten und Crustaceen, sowie Sequenzen verschiedener Phenoloxidasen wurde zuerst ein Multisequenzalignment erstellt. Mit diesem Alignment konnte dann mit dem PHYLIP Programmpaket (Felsenstein, 2000) eine phylogenetische Analyse nach verschiedenen Methoden durchgeführt werden. Es wurden Maximum Parsimony und Distanz-Matrix orientierte Methoden verwendet (Maximum Parsimony und Neighbor Joining). Als Außengruppe dienten die Phenoloxidasen, die den ältesten Ast der Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoden repräsentieren (Sánchez *et al.*, 1998; Burmester, 2001). Die Ergebnisse lieferten jedoch für die Position der Myriapoda keine einheitlichen Stammbäume. Die Distanzmatrix Methoden favorisieren das Myriapoden-Hämocyanin als Schwestergruppe der Crustacea und Insecta (Mandibulata) mit einem Wert von (61%) (Abb. 30), während die Parsimony Methode ein Schwestergruppenverhältnis der Myriapoden-Hämocyaninen mit denen der Cheliceraten mit einem Bootstrapwert von 100% unterstützt (Abb. 31). Die Insektenproteine sind jedoch nach beiden Methoden sehr nahe mit denen der Crustacea verwandt und bilden mit diesen eine Schwestergruppe (100%).





**Abb. 30: Phylogenetische Position des Myriapodenhäemocyanins im Stammbaum der Häemocyaninsuperfamilie der Arthropoden.**

Ein Multisequenz-Alignment der Häemocyaninsuperfamilie wurde mit der „Neighbor-Joining“ Methode analysiert. Die Zahlen an den Ästen geben die statistische Absicherung des Stammbaums wieder, die mit der Methode des „bootstrapping“ berechnet wurden. ScoHc1 und 2, *Scutigera coleoptrata* Häemocyanin; SpiHc1, *Spirostreptus* spec. Häemocyanin; SamHc, *Schistocerca americana* Häemocyanin; PinHcA, B und C, *Panulirus interruptus* Häemocyanin C; CmaHc6, *Cancer magister* Häemocyanin 6; CsaHc, *Callinectes sapidus* Häemocyanin; PvaHc und Hc1, *Pennaeus vanamei* Häemocyanin; HamHcA, *Homarus americanus* Häemocyanin A; PelHc1-3, *Palinurus elephas* Häemocyanin; EcaHcA bis G, *Eurypelma californicum* Häemocyanin; LpoHc2, *Limulus polyphemus* Häemocyanin; AauHc6, *Androctonus australis* Häemocyanin; TtrHcA, *Tachypleus tridentatus* Häemocyanin.



**Abb. 31: Phylogenetische Position des Myriapodenhäemocyanins im Stammbaum der Häemocyaninsuperfamilie der Arthropoden.**

Ein Multisequenzalignment der Häemocyaninsuperfamilie wurde mit der „Maximum Parsimony“ Methode analysiert. Die Zahlen an den Ästen geben die statistische Absicherung des Stammbaums wieder, die mit der Methode des „bootstrapping“ berechnet wurden. ScoHc1 und 2, *Scutigera coleoptrata* Häemocyanin; SpiHc1, *Spirostreptus* spec. Häemocyanin; SamHc, *Schistocerca americana* Häemocyanin; PinHcA, B und C, *Panulirus interruptus* Häemocyanin C; CmaHc6, *Cancer magister* Häemocyanin 6; CsaHc, *Callinectes sapidus* Häemocyanin; PvaHc und Hc1, *Pennaeus vanamei* Häemocyanin; HamHcA, *Homarus americanus* Häemocyanin A; PelHc1-3, *Palinurus elephas* Häemocyanin; EcaHcA bis G, *Eurypelma californicum* Häemocyanin; LpoHc2, *Limulus polyphemus* Häemocyanin; AauHc6, *Androctonus australis* Häemocyanin; TtrHcA, *Tachypleus tridentatus* Häemocyanin.

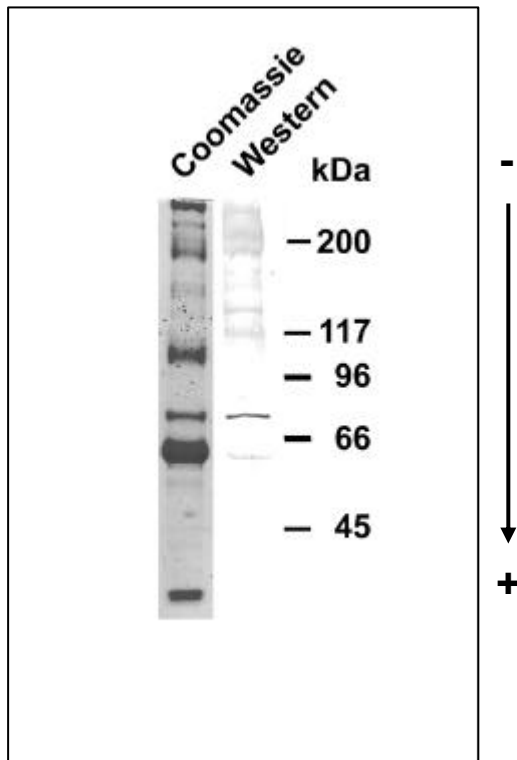
### 3. Hämocyanin bei den Onychophora

Die Onychophoren werden von manchen Autoren als Proarthropoden eingeordnet und sind deshalb aus phylogentischer Sicht äußerst interessante Objekte. Ein respiratorisches Protein war bei diesen Tieren bislang nicht bekannt. In eigenen Untersuchungen konnte jedoch ein Hämocyanin biochemisch nachgewiesen werden und sollte auf molekularbilogischer Ebene näher charakterisiert werden.

Die hier verwendeten Tiere stellte Frau Dr. H. Ruhberg (Zoologisches Institut, Universität Hamburg) freundlicherweise aus ihrer Zucht zur Verfügung.

#### 3.1 Biochemische Charakterisierung des Hämocyanins von *Epiperipatus spec.*

Die biochemische Untersuchung der Hämolympheproteine von *Epiperipatus spec.* stellte sich aufgrund der geringen Menge als äußerst schwierig heraus. In einer SDS-PAGE und einem Westernblot konnte allerdings ein Hämocyanin-ähnliches Protein identifiziert werden. Im Blot wurde ein Protein von etwa 75 kDa von einem anti-*Homarus*-Hämocyanin Antikörper erkannt (Abb. 32).

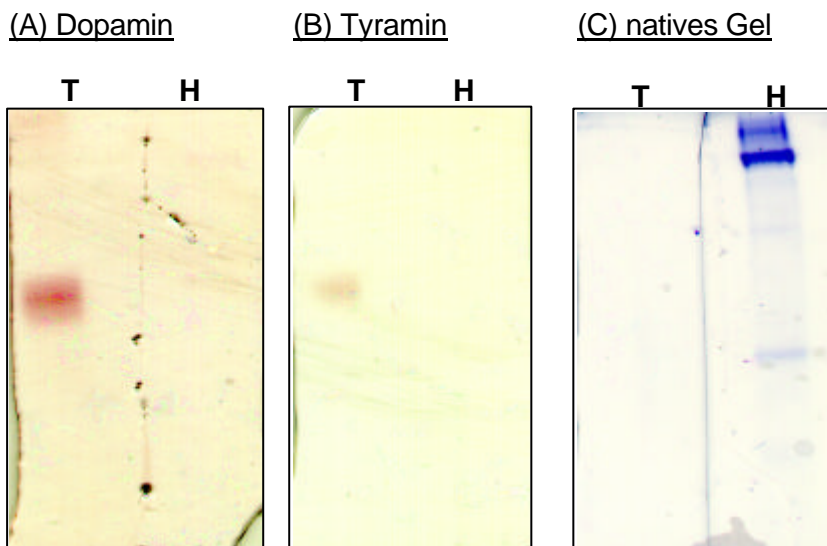


**Abb 32: SDS-PAGE und Westernblot mit Hämolympheproteinen von *Epiperipatus***

Die Hämolympheproteine von *Epiperipatus* wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt. In einem Westernblot konnte mit einem anti-*Homarus*-Hämocyanin-Antikörper eine Bande im Bereich von etwa 75 kDa detektiert werden.

### 3.2 Test auf Phenoloxidaseaktivität

Mit der Hämolymphe von *Epiperipatus spec.* wurde ein Test auf Phenoloxidaseaktivität durchgeführt (Abb. 33). Dabei wurden etwa 10 µl Hämolymphe (H) (entspricht einem Gesamtproteingehalt von etwa 10 µg) und 10 µg einer aufgereinigten Tyrosinase (T) eines Pilzes als Positivkontrolle in einer nativen PAGE aufgetrennt. Als Substrat für die Reaktion wurde Dopamin (siehe A) und Tyramin (siehe B) verwendet. Nach etwa 30 min wurde die Reaktion noch mit SDS induziert (Decker *et al.*, 2001). In der Positivkontrolle ist die Umsetzung des Substrats durch die Tyrosinase (T) eindeutig als Farbreaktion zu sehen. Das Ergebnis für die Hämolymphe von *Epiperipatus spec.* (H) ist definitiv negativ, so dass man annehmen kann, dass es sich wahrscheinlich um ein echtes Hämocyanin mit Sauerstoffbindungseigenschaften handelt.



**Abb. 33: Test auf Phenoloxidaseaktivität**

(A) Eine Tyrosinase (T) und Hämolympheproteine von *Epiperipatus spec.* (H) wurden in einem nativen Gel aufgetrennt und mit Dopamin als Substrat für die Umsetzung durch eine Phenoloxidase zugegeben.

(B) Eine Tyrosinase (T) und Hämolympheproteine von *Epiperipatus spec.* (H) wurden in einem nativen Gel aufgetrennt und mit Tyramin als Substrat für die Umsetzung durch eine Phenoloxidase zugegeben. In (C) ist das mit Coomassie gefärbte native Gel gezeigt. Die Tyrosinase ist unterhalb der Nachweisgrenze. In beiden Fällen gab es eine positive Reaktion bei der Tyrosinase und eine negative bei der Hämolymphe von *Epiperipatus spec.* .

### 3.3 Molekularbiologische Charakterisierung des Hämocyanins von *Epiperipatus*

Zunächst erstellte ich eine cDNA-Bank von *Epiperipatus*. Dazu wurde die Gesamt-RNA eines kompletten Tieres präpariert und mit dem PolyAtract Kit der Firma Promega die mRNA isoliert. Für die Erststrangsynthese hatte ich aufgrund der geringen Ausbeute nur etwa 1-3 µg PolyA<sup>+</sup>-RNA zur Verfügung. Trotzdem konnte eine cDNA Bank von hoher Qualität erzeugt werden, bei der es sich unseres Wissens um die erste cDNA-Bank eines Onychophoren handelt. Sie hat einen Primärtiter von etwa 300 000 pfu/ml und konnte auf einen Endtiter von  $1.5 \times 10^9$  pfu/ml amplifiziert werden.

Da kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, wurde die Bank mit anti-*Homarus*-Hämocyanin-Antikörpern und dem anti-*Spirostreptus*-Hämocyanin Antikörper nacheinander nach Hämocyanin Klonen durchsucht, was jedoch ohne Erfolg blieb. Ich entschloss mich daher zu der Strategie mit Vektorprimern (T3 oder T7) und degenerierten Primern der Kupferbindungsstellen und anderen hochkonservierten Bereichen des Hämocyanins die cDNA-Bank über PCR zu amplifizieren und mit dem spezifischen PCR-Fragment dann eine DNA-Sonde herzustellen. Ein etwa 1128 bp langes PCR-Fragment konnte ich schließlich mit den degenerierten Primern CGW und T3 und einer daran anschließenden Reamplifikation mit CGW und CuA1 erhalten. Dieses Produkt konnte dann in den Klonierungsvektor PCR II TOPO XL kloniert werden und stellte sich nach einer Sequenzierung als Hämocyanin-Teilsequenz heraus. Aus diesem Fragment konnte eine Dig-markierte DNA-Sonde hergestellt werden und damit die *Epiperipatus*-Bank durchgescreent werden. Tatsächlich erhielt ich einen vollständigen cDNA-Klon eines Hämocyanins, der von beiden Seiten ansequenziert werden konnte und mittels *primerwalking* vervollständigt wurde. Dieser Klon umfasst 2287 bp und kodiert für eine vollständige Hämocyanin-Untereinheit mit 641 Aminosäuren (Abb. 34). Die errechnete Molekülmasse beträgt 73.6 kDa. Durch eine Computeranalyse der Sequenz mit dem ExPasy Programm SignalP V1.1 kann man vermuten, dass das Hämocyanin von *Epiperipatus spec.* kein Signalpeptid besitzt.

OnyHc

	GTTGAGCAAGCAGCACACA	17
<b>ATC</b>	CCTTCAACATCTCAACAAAAAGAAGTATTGGATTTTTTTAATATTTCCCGAAACGCGTCGAGTATCACGCGCAAAACAAAAAGATAAA	107
M P S T S Q Q K E V L D F F N I P E T R R V S R A K Q K D K		30
CCGTCTGTAATTTTCAAACCTTTACCAGCTGGAATCGGAAAACCTTAAAAAGGGAAATTTATTTTCTCCGTTTATTAAGACATCGAGAA		197
P S V I F K P L P A G I G K L K K G N L F S P F I K R H R E		60
GAATCTACAAAAGTTATGAATTTCTTTTAGACAGTAAAGATTATAAAGGATTTTTTAGAAAAACGTCGCCAGTCTTAGACCCGTTGTAAC		287
E S T K V I E F L L D S K D Y K G F L E N A A S L R P V V N		90
GAAATCTTTTTGTTTACTGTTTCAGTGTGGCTTTGTACCAGTCTCCCACACGACAAATCTTCTAGCGCCGCAATATGGCAAACCTATG		377
E I L F V Y C F S V A L Y Q S P H T T N L L A P P I W Q T M		120
CCGTATGATTTTTTTGATCAAAGAGTAGAAAATCAGATTAATGGTATTATTGAAAGCACAAAAGGCGCACCAGATAAAACAACCTATACAA		467
P Y D F F D Q R V E N Q I N G I I E S T K G A P D K Q P I Q		150
GTAATATTAGAACCACTGGTAACAATAGAGATCCTGAATTTAAACTATCCTACTTTAGAGAAGATATTGCTATAAATTTCTCACCATTGG		557
V I L E P T G N N R D P E F K L S Y F R E D I A I N S H <b>H</b> W		180
CACTGGCATGTGATCTACCCAGTAGGATCAAATCCATCTGATAAAAAAATTAACCGAAAAGGAGAATTATTTTACTATATGCACGAGCAA		647
H W <b>H</b> V I Y P V G S N P S D K K I N R K G E L F Y Y M <b>H</b> E Q		210
ATGTTAGCTCGCTATGATGCAGAAAAGATTGTGAATGGAATGAGAAGAGTGAAGTCACTTACGATTATGATGAATAAATTCAGAAGGT		737
M L A R Y D A E R L C N G M R R V K S L H D Y D E I I P E G		240
TATTATCCAAGACTTCATTCTAAAATTTCTGGAAGTGAATATGCCTCCCGTCAGGCTAACACTCGCATGATGGATACTTTGGATAACACT		827
Y Y P R L H S K I S G T E Y A S R Q A N T R M M D T L D N T		270
GTCATTGAATTAGAGAGATTTAGAGAAAAGATAGAACATGCTATTCTGTTGGATATATTGAACTACCAGATAATACTAAAACCTCTTTG		917
V I E L E R F R E R I E H A I S V G Y I E L P D N T K T P L		300
AATAATGAACAAGGTATTGATATTTTGGCTGACCTTATAGAAGCAAGCAATACAGTCTCAATGGTGCATATTATGGCGATTTCGATAAT		1007
N N E Q G I D I L A D L I E A S N Y S L N G A Y Y G D L <b>H</b> N		330
ACAGGTCAATGTGATGTTAGCTACTGCACATGATCTGACAAACGCTTCAATCTTCAGATGGTGTGATGGGTTTTGTACAAAACAGCTTTA		1097
T G <b>H</b> V M L A T A H D P D K R F N S S D G V M G F V Q T A L		360
AGAGATCCATTGTTTATAGATGGCATAAACATATTGATAATCTGCTTCAAGATCATAAGAGAACATTACAACCATACACTGACAAAAGAG		1187
R D P L F Y R W <b>H</b> K H I D N L L Q N H K R T L Q P Y T D K E		390
CTTATTGCAGATAAAAATGAAATTAAGGAAGCTTCTATCACATCAAGCCAAAACAAGGATCTAAAACAAGTTATATACTTTTTTTGAT		1277
L I A D K I E I K E A S I T S S Q T K D P K N K L Y T F F D		420
ACTAAACAATTGAATTTGACTAAAGGATTAGACTTTGGAAACTTGGAAACAAAGCATTTTAGTTACAATTACGCATCTTCAACATGAAGAA		1367
T K Q L N L T K G L D F G N L E Q S I L V T I T H L Q H E E		450
TTTACTTATAATATCAAAGTAAACAACAACAGGCAAAGATTTTACTGGTACATTCAAGATATTATGGCTCCAAAAAATGATGATCTA		1457
F T Y N I K V N N N T G K D F T G T F R I F M A P K N D D L		480
GATATACCAATGGAATAAATGAACAGCGCATATTGATGATAGAAATGGATAAAATTCAGTTGAAATTATACCAGAGAGAGAATAATATC		1547
D I P M E I N E Q R I L M I E M D K F Q L K L S P G E N N I		510
ACTCGTAAATCAGAAGATTCAAATGTTACACTGCACAAAGAAATGACTTGGGAAATGATTGAGAATCAACCTGATACTTCTGGCCCATCA		1637
T R K S E D S N V T L H K E M T W E M I E N Q P D T S G P S		540
TCTCAACACTATTGTGCGCTGTGGATGGCCCCACCATTGCTGATTCTCAAGGTTCTGCTCAAGGAACAGCTTCCATTGTTTTATTATG		1727
S Q H Y C A C G W P H H L L I P K G S A Q G T A F H C F I M		570
ATTACTGATTGGAAACTGATGAAGTTAAAAGTTCTAAGAAACCCACTTGTCAAGATGCAGTTAGCTACTGTGGAATCATAAATGATCTC		1817
I T D W K T D E V K S S K K P T C Q D A V S Y C G I I N D L		600

TATCCAGATAAAAAACCTATGGGTTTCCTTTTGATAGATTGATTCCTTCTGACTTGGCAACTTTTGTTCAGATCCAACATGAAAATT	1907
Y P D K K P M G F P F D R L I P S D L A T F V S R S N M K I	630
TTTGATATATCTATTATACATCGAGAAAAAAATAGTTCTTAAATTGGAGATTGCATCATCACAGAATAATGATGACGACTTTTAAATCT	1997
F D I S I I H R E K K ***	642
TTTGCCTTGTGGTTAAAGCTTACATTTGCATATTGCTACCATTTATATTATGGATCCATTTAATCAGTGTAAATTCACACTTTCTATAC	2087
CAAAAAAGAAGGAAGTAATAATTTGTTGATTTTTTTTTTCAAGAGAAAACCTTTATAGCAGTCCAGGCAGAAGAAGAAATTTTGGAGAGT	2177
TTTGAATTCAACACTTTAATAAAGCTTATTATAATATTTATATTATTATATTTTTCAGCATACTTCAAATAATAAATGTTTTTTTAAATC	2267
TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2286

**Abb. 34: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Epiperipatus spec. Hc***

Abgebildet ist die komplette Nukleotidsequenz des Hämocyanins von *Epiperipatus*, sowie die Translation in Aminosäuren.

Startcodon : grün unterlegt.

Stopcodon : Rot unterlegt.

Polyadenilierungssignal : liegt 24 bp vor dem PolyA<sup>+</sup>-Schwanz und ist violett unterlegt.

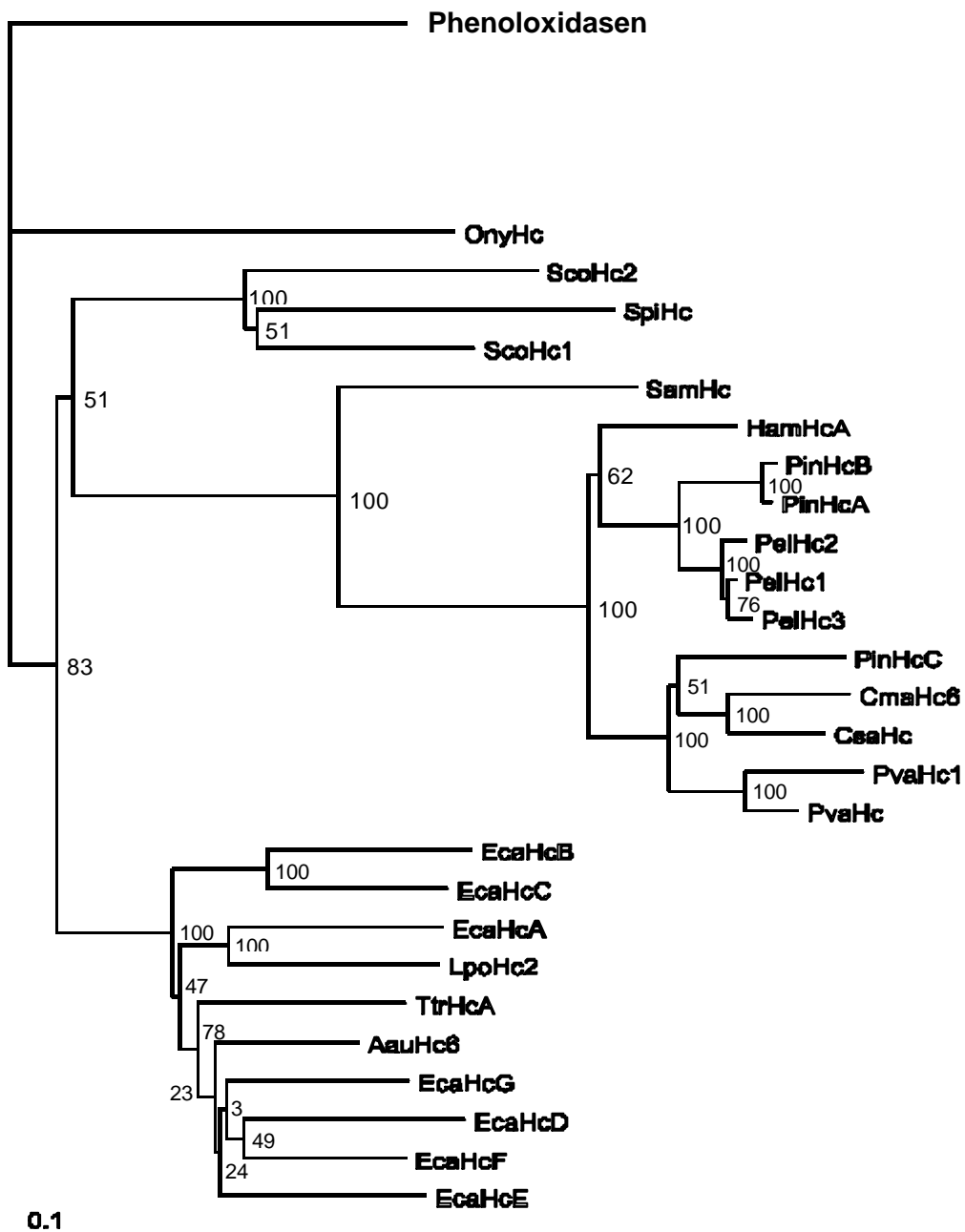
Die Histidine, die mit den Kupferionen der Kupferbindungsstelle koordiniert sind, sind blau unterlegt.



### 3.2. Phylogenetische Auswertung der Hämocyaninsequenz von Onychophoren

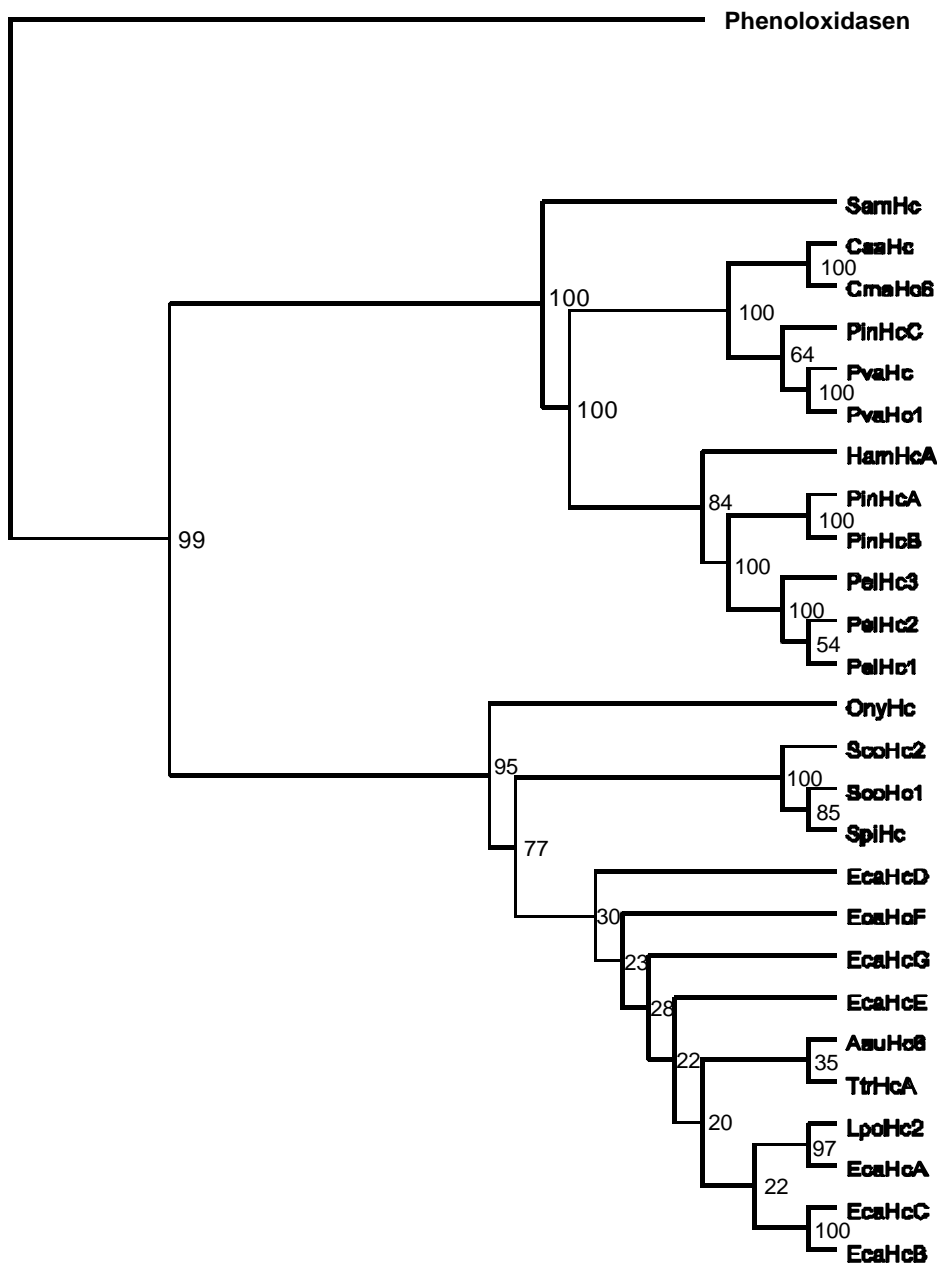
Zur Durchführung der phylogenetischen Analyse wurde zunächst ein Multisequenz-Alignment der Hämocyaninsequenzen von *Epiperipatus spec.* und der Cheliceraten, Insekten und Crustaceen, sowie Phenoloxidasen erstellt. Unter Verwendung des PHYLIP Programmpakets (Felsenstein, 2000) konnten dann Stammbäume nach verschiedenen Evolutionsmodellen berechnet werden. Es wurden Maximum Parsimony und Distanzmatrix-orientierte Methoden zur molekularphylogenetischen Analyse verwendet, die unter B 16 beschrieben werden. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurde die „Bootstrapping“-Methode benutzt. Als Außengruppe fiel die Wahl aus oben beschriebenen Gründen auf die Phenoloxidasen.

In diesen phylogenetischen Analysen zeigte sich bei Verwendung der „Neighbor-Joining“-Methode eine eindeutig basale Stellung des Onychophorenhämocyanins im Vergleich zu den anderen Arthropodenhämocyaninen (Abb. 35). Bei einer „Maximum Parsimony“-Analyse gruppiert sich das Hämocyanin von *Epiperipatus* mit den Myriapoden – und Cheliceratenhämocyaninen zusammen, wobei die Crustaceen – und das Insektenhämocyanin einen gemeinsamen Ast bilden (Abb. 36). Dieses Ergebnis wird mit einem Bootstrapwert von 95% unterstützt.



**Abb. 35: Phylogenetische Position des Onychophorenhäemocyanins im Stammbaum der Häemocyanin-Superfamilie der Arthropoden.**

Ein Multisequenz-Alignment der Häemocyanin-Superfamilie wurde mit der „Neighbor Joining“ Methode analysiert. Die Zahlen an den Ästen geben die statistische Absicherung des Stammbaums wieder, die mit der Methode des „bootstrapping“ berechnet wurden. OnyHc, *Epiperipatus* Häemocyanin; ScoHc1 und 2, *Scutigera coleoptrata* Häemocyanin; SpiHc1, *Spirostreptus* spec. Häemocyanin; SamHc, *Schistocerca americana* Häemocyanin; PinHcA, B und C, *Panulirus interruptus* Häemocyanin C; CmaHc6, *Cancer magister* Häemocyanin 6; CsaHc, *Callinectes sapidus* Häemocyanin; PvaHc und Hc1, *Pennaeus vanamei* Häemocyanin; HamHcA, *Homarus americanus* Häemocyanin A; PelHc1-3, *Palinurus elephas* Häemocyanin; EcaHcA bis G, *Eurypelma californicum* Häemocyanin; LpoHc2, *Limulus polyphemus* Häemocyanin; AauHc6, *Androctonus australis* Häemocyanin; TtrHcA, *Tachypleus tridentatus* Häemocyanin.



**Abb. 36: Phylogenetische Position des Onychophorenhäemocyanins im Stammbaum der Häemocyanin-Superfamilie der Arthropoden.**

Ein Multisequenz-Alignment der Häemocyanin-Superfamilie wurde mit der „Maximum Parsimony“ Methode analysiert. Die Zahlen an den Ästen geben die statistische Absicherung des Stammbaums wieder, die mit der Methode des „bootstrapping“ berechnet wurden. OnyHc, *Epiperipatus* Häemocyanin; ScoHc1 und 2, *Scutigera coleoptrata* Häemocyanin; SpiHc1, *Spirostreptus* spec. Häemocyanin; SamHc, *Schistocerca americana* Häemocyanin; PinHcA, B und C, *Panulirus interruptus* Häemocyanin C; CmaHc6, *Cancer magister* Häemocyanin 6; CsaHc, *Callinectes sapidus* Häemocyanin; PvaHc und Hc1, *Pennaeus vanamei* Häemocyanin; HamHcA, *Homarus americanus* Häemocyanin A; PelHc1-3, *Palinurus elephas* Häemocyanin; EcaHcA bis G, *Eurypelma californicum* Häemocyanin; LpoHc2, *Limulus polyphemus* Häemocyanin; AuuHc6, *Androctonus australis* Häemocyanin; TtrHcA, *Tachypleus tridentatus* Häemocyanin.

## **D. Diskussion**

Hämocyanin ist das respiratorische Protein vieler Arthropoden. Zu Beginn meiner Arbeit war dieses Protein hauptsächlich bei Vertretern der höheren Krebse (Malacostraca) und der Chelicerata (Arachnida und Xiphosura) beschrieben. Daten von anderen Arthropoda fehlten beinahe ganz. In der embryonalen Hämolymphe der Heuschrecke *Schistocerca americana* konnte die Existenz eines Hämocyanins nachgewiesen werden (Sánchez *et al.*, 1998). Bei den Myriapoda wurde bei *Scutigera coleoptrata* und *Scutigera longicornis* ein 6x6 Hämocyanin beschrieben (Rajulu, 1969; Mangum *et al.*, 1985; Gebauer und Markl, 1999). Ansonsten schien Hämocyanin jedoch bei den Insecta und Myriapoda nicht vorhanden zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hämocyanine verschiedener Crustaceen, Myriapoden und eines Onychophoren analysiert. Mit den Sequenzen wurde eine umfangreiche phylogenetische Analyse durchgeführt. Es handelt sich bei den untersuchten Tieren überwiegend um Mitglieder von Taxa, deren Position im Arthropoden-Stammbaum umstritten ist. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Arbeit im Hinblick auf die Struktur, Funktion und Evolution des Hämocyanins der Arthropoden diskutiert werden.

### **1. Die Hämocyanine der Crustacea**

Hämocyanine wurden bislang in allen untersuchten Vertretern der malakostraken Crustaceen gefunden (Mangum, 1983; Markl, 1986). In anderen Unterklassen der Crustaceen sind sie, von eventuellen Ausnahmen abgesehen (Yager, 1991; Hodgson und Spicer, 2001), nicht vorhanden. Aufgrund ihrer weiten Verbreitung innerhalb der Cheliceraten, kann man annehmen, dass Hämocyanine bereits in der Stammlinie der Crustaceen vorhanden waren.

Die Grundeinheit eines Crustaceenhämocyanins ist wie bei allen Arthropodenhämocyaninen ein Hexamer. Diese können sich zu Oligo-Hexameren zusammenlagern. Bei Crustaceen sind Hämocyanine von 1x6 (z.B. *Palinurus elephas*) über 2x6 (z.B. *Homarus americanus*) bis zu 4x6 (z.B. *Callinassa californiensis*) näher beschrieben. Besonders auffällig ist die starke Heterogenität der Untereinheiten (Markl, 1986). Diese ermöglicht zum einen die Bildung größerer Aggregate als ein Hexamer, zum anderen lässt sich damit die funktionelle Plastizität des Hämocyaninmoleküls erklären (Markl und Decker, 1992). Die Sauerstoffbindungseigenschaften werden

durch Interaktionen zwischen den Untereinheiten und Konformationsänderungen beeinflusst. Die Bildung von Hexameren ist für die Funktion als reversibler Sauerstofftransporter von großer Bedeutung, denn nur durch die allosterische Wechselwirkung kann das Molekül effektiv beladen bzw. entladen werden. Für eine kooperative Sauerstoffbindung sind mindestens zwei Konformationen notwendig. Versuche zu den O<sub>2</sub>-Bindungseigenschaften verschiedener Crustaceenhämocyanine ergaben für den Hummer *Homarus americanus* drei und für die Languste *Panulirus interruptus* zwei unterschiedliche Konformationen (Decker *et al.*, 1997; Volbeda *et al.*, 1989; Wyman, 1984; Richey *et al.*, 1985). Somit ist die charakteristische Quartärstruktur des Moleküls und die Diversität der Hämocyanin-Untereinheiten ausschlaggebend für die Sauerstoffaffinität, den Bohr-Effekt und die Kooperativität des gesamten Proteins.

Der amerikanische Hummer *Homarus americanus* besitzt ein 2x6 Hämocyanin, das aus mehreren unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut ist. (Markl, 1979; Markl, 1986; Markl *et al.*, 1986; Stöcker *et al.*, 1988; Mangum und Joy, 1997). Durch biochemische Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten in einer SDS-PAGE drei diskrete Untereinheiten identifiziert werden (siehe C1.1.1, Abb. 16). Aufgrund der N-terminalen Sequenzen lassen sich die drei hier gefundenen Untereinheiten den auf immunologischer Ebene von Markl (1986) beschriebenen Typen der Crustaceenhämocyanine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) zuordnen. Vergleicht man die in dieser Arbeit identifizierten Untereinheiten mit denen aus der Publikation von Stöcker *et al.* (1988), so entspricht der  $\beta$ -Typ HcB der Untereinheit 6 und HcG ( $\gamma$ -Typ) der Untereinheit 4. Darüber hinaus kann man vermuten, dass die HcA Bande eine Mischung aus vier  $\alpha$ -Typ Untereinheiten ist (1, 2, 3 und 5 nach Stöcker *et al.*, 1988), die in ihrem N-Terminus nahezu identisch sind. Bei der Verunreinigung der Proteinsequenz der HcB Bande (HcA') könnte es sich um ein Protein handeln, das mit Untereinheit 1 in Stöcker *et al.* (1988) identisch ist, das heißt, es wandert sehr nahe der HcB Bande (Untereinheit 6) in der SDS-PAGE. Die drei hier ermittelten aminoterminalen Sequenzen (C.1.1.2) unterscheiden sich grundlegend von denen von Stoeva *et al.* für das gleiche Hämocyanin publizierten (1999). Da die hier ermittelte N-terminale Sequenz der HcA-Untereinheit jedoch identisch mit der aus einem cDNA-Klon ist (Abb. 17), gehe ich davon aus, dass die in Abschnitt C1.1.2 gezeigten aminoterminalen Sequenzen korrekt sind. Leider konnten die beiden anderen Untereinheiten (HcB und HcG) nicht als cDNA-Klone isoliert werden, obwohl die entsprechenden Polypeptide durch SDS-PAGE und N-terminale Proteinsequenzierung

nachweisbar waren. Der Grund, warum nur Klone des  $\alpha$ -Typs gefunden wurden ist unklar. Es ist selbstverständlich möglich, dass die Klone zwar in der Expressionsbank vorhanden waren, aber trotz intensiven Screenings nicht gefunden wurden. Eine andere, jedoch eher unwahrscheinliche Möglichkeit wäre, dass die mRNAs der beiden anderen Untereinheiten während der Präparation einer stärkeren Degradation durch RNasen ausgesetzt waren. Die dritte Erklärung könnte eine von physiologischen Bedingungen und Entwicklungsstadien abhängige Biosynthese bestimmter Untereinheiten sein. Diese Möglichkeit wurde auch schon von anderen Autoren diskutiert (Durstewitz und Terwilliger, 1997; Terwilliger, 1998; Stoeva *et al.*, 1999). Es existieren Daten, die zeigen, dass Hämocyanin und Kupfermengen während der Häutung sinken und bei osmotischem Stress steigen (Hagermann, 1983). Man muss außerdem bedenken, dass die untersuchten Tiere in Kanada gefangen und nach Deutschland transportiert werden mussten. Diese Umstände könnten dafür verantwortlich sein, dass der Metabolismus auf die Expression nur einer Untereinheit umgestellt wurde. Andererseits ist bekannt, dass die Untereinheit  $\alpha$  nicht allein in der Lage ist, ein hexameres Hämocyanin zu bilden (Stöcker *et al.*, 1988). Jedoch ist die  $\alpha$ -Untereinheit der Grundbaustein eines Crustaceen Hämocyanins, da sie in allen bekannten Crustaceen Hämocyaninen vorhanden ist, während die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bei Vertretern mit 1x6 Hämocyanin fehlen können (siehe Markl, 1986).

Die europäische Languste *Palinurus elephas* besitzt ein 1 x 6 Hämocyanin. Markl *et al.* (1979) fanden bei ihr elektrophoretisch sechs verschiedene Untereinheiten, während Neuteboom *et al.* (1989) nur vier identifizieren konnten. Auf immunologischer Ebene ließen sich alle Untereinheiten dem  $\alpha$ -Typ-Hämocyanin zuordnen (Markl, 1986; Neuteboom *et al.*, 1989; Jekel *et al.*, 1996). Bei der nah verwandten amerikanischen Languste *Panulirus interruptus* gibt es zusätzlich noch eine Untereinheit des  $\gamma$ -Typs (Markl, 1986). Diese immunologisch definierten Untereinheiten-Kategorien kann man auch in Analysen der Primärstruktur des Hämocyanins wiedererkennen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Identifizierung von neun leicht unterschiedlichen Hämocyanin-cDNA-Klonen, bei denen man aufgrund von Sequenzvergleichen davon ausgehen kann, dass es sich um drei verschiedene Untereinheiten handelt. Diese wurden mit PelHc1, PelHc2 und PelHc3 bezeichnet. Sie haben zwischen 94 und 96% Identität im kodierenden Bereich (siehe Tab. 2). Vergleicht man diese Sequenzen mit jenen der bereits bekannten, auf Proteinebene ermittelten Hämocyaninuntereinheit von *P. elephas* (= *P. vulgaris*) (Jekel *et al.*, 1996), so sind sie im Wesentlichen identisch. Die auf cDNA Ebene ermittelten Sequenzen unterscheiden sich in 45 bis 56 Aminosäuren

von denen der Proteinsequenzierung. Die auftretenden Unterschiede lassen sich dadurch erklären, dass bei der Untersuchung der Proteinsequenzen von Jekel *et al.* die Sequenzierung mit einem Gemisch aus mehreren sehr ähnlichen Untereinheiten durchgeführt wurde. Eventuell existiert auch noch eine vierte, noch nicht auf cDNA-Ebene gefundene Hämocyaninuntereinheit, die jedoch in der Proteinsequenzierung von Jekel *et al.* (1996) auftaucht. Ein Vergleich der ermittelten Sequenzen von *P. elephas* mit den bereits bekannten Sequenzen von *P. interruptus* zeigt etwa 20% Sequenzunterschiede (siehe Tab. 2). Unter Annahme einer molekularen Uhr haben sich die Hämocyanine der beiden Langustenarten vor etwa 100 Millionen Jahren aufgetrennt, wobei aufgrund von Fossilfunden lediglich nur 20 Mio. Jahre erwartet worden waren (Cobb und Philipps, 1980) (siehe: Abb. 37: linearisierter Stammbaum der Crustacea).

In einem Projekt innerhalb der Arbeitsgruppe wurden die Sequenzen von *P. elephas*-Hämocyanin auf die bekannte Röntgenstruktur des *P. interruptus*-Hämocyanins modelliert. Das daraus resultierende Hexamer stimmt hervorragend mit einer aus 9 970 kryo-elektronenmikroskopischen Einzelbildern rekonstruierten 3D-Struktur von *P. elephas*-Hämocyanin überein (Meißner *et al.*, in Vorbereitung).

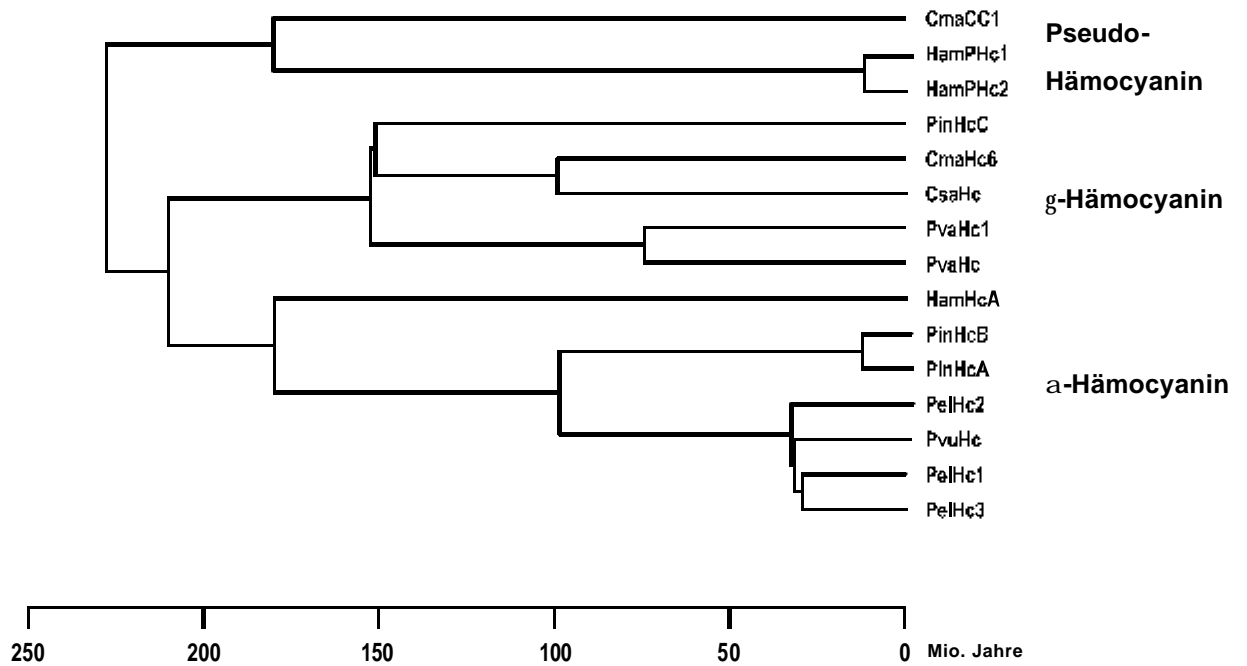
Der Biosyntheseort des Hämocyanins ist nur bei wenigen Spezies bekannt (Übersichtsartikel: Markl und Decker, 1992). Bei den bisher untersuchten Crustaceen geht man davon aus, dass das Hämocyanin in Zellen der Mitteldarmdrüse exprimiert wird und mit Hilfe eines Signalpeptids vom Biosyntheseort über das endoplasmatische Retikulum freigegeben wird. In der Tat besitzt die Untereinheit  $\alpha$  von *H. americanus* mit großer Sicherheit ein Signalpeptid, obwohl die cDNA-Sequenz nur einen Teil davon abdeckt (Abb. 17). In einer Northernblot Analyse konnte gezeigt werden, dass die Mitteldarmdrüse der Biosyntheseort des Hämocyanins bei *H. americanus* ist (Abb. 18). Diese Daten stimmen mit der Arbeit von Senkbeil und Wriston (1981) überein, in der die Mitteldarmdrüse mit Hilfe radioaktiv markierter Aminosäuren als Expressionsort des Hämocyanins bei *Homarus americanus* beschrieben wurde. Im Gegensatz dazu wird das Pseudohämocyanin, das ebenfalls ein Mitglied der Hämocyaninsuperfamilie ist und eine nahe Sequenzverwandtschaft aufweist, im Herz und in den Ovarien exprimiert (Burmester, 1999).

## 1.1 Die Evolution der Hämocyanin-Untereinheiten dekapoder Crustaceen

Durch umfangreiche Untersuchungen der Hämocyanine der dekapoden Crustaceen konnten drei immunologisch unterschiedliche Typen von Untereinheiten charakterisiert werden. Diese wurden mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet (Markl, 1986). Die  $\alpha$ -Untereinheit wird als Grundbaustein eines Hämocyanin-Hexamers angesehen, wobei die beiden anderen Typen aber essentiell für den Aufbau eines von 2x6 Aggregaten sind (Stöcker *et al.*, 1988). Die im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Hämocyanin Untereinheiten von *Homarus americanus* und *Palinurus elephas* gehören alle zum  $\alpha$ -Typ. HamHcA teilt mit PelHc1 67,8% Identität im kodierenden Bereich, mit PelHc2 67,2% und mit PelHc3 67,5%. Im Stammbaum der Hämocyaninuntereinheiten der Crustaceen bilden sie mit allen anderen bekannten  $\alpha$ -Untereinheiten einen gemeinsamen Ast, der mit Bootstrap-Werten von 100 abgesichert ist (Abb. 23 und 24). Untereinheiten des Typs  $\gamma$  sind bei *Panulirus vulgaris*, *Panulirus interruptus* und *Cancer magister* sequenziert und gruppieren sich im Stammbaum mit sehr guter statistischer Absicherung (Abb. 23 und 24). Sequenzdaten des  $\beta$ -Typs liegen bislang nicht vor. Anhand der Aufspaltungseignisse innerhalb der Dekapoda und den dazugehörigen paläontologische Daten konnten die Aminosäure-Austauschraten ermittelt werden. Diese betragen  $1,15 \pm 0,04 \times 10^{-9}$  Substitutionen pro Position und Jahr für die  $\alpha$ -Untereinheit und  $1,48 \pm 0,09 \times 10^{-9}$  pro Position und Jahr für die  $\gamma$ -Untereinheit. Wie man sieht, unterscheiden sich  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten in ihren Evolutionsraten; die  $\gamma$ -Untereinheit evolviert etwa 25% schneller als die  $\alpha$ -Untereinheit. Dies passt zu der Hypothese, dass die  $\alpha$ -Untereinheit stammesgeschichtlich älter ist bzw. eine stärker konservierte Oberflächenstruktur hat. Aus diesem Grund können Antikörper, die gegen diesen Untereinheitstyp hergestellt wurden, mit Hämocyaninen nicht-dekapoder Malakostraka kreuzreagieren (siehe auch Markl, 1986; Burmester, 2001).

Um einen linearisierten Stammbaum zu erstellen wurden Daten aus paläontologischen Studien als Referenz benutzt. Man kann dabei davon ausgehen, dass sich die Brachyura und Palinura vor etwa 150 Millionen Jahren getrennt haben, wobei die Auftrennung der Astacura und Palinura vor ca. 180 Millionen Jahren erfolgte (Briggs *et al.*, 1993). Die Berechnung der einzelnen Aufspaltungseignisse erfolgte, indem die Werte in das EXCEL Tabellenkalkulationsprogramm übertragen wurden. Legt man dann eine Zeitachse an, so sieht man, dass sich der  $\alpha$ - vom  $\gamma$ -Typ vor  $214 \pm 14$  Millionen Jahren trennte und die Pseudohämocyanine vor etwa  $238 \pm 27$  Millionen Jahren aus den Hämocyaninen entstanden





**Abb. 37: Linearisierter Stammbaum der Hämocyanine und Pseudohämocyanine der Crustacea**

Dieser Stammbaum wurde unter Annahme einer molekularen Uhr erstellt und mit Hilfe paläontologischer Daten (Briggs *et al.*, 1993) berechnet. CmaCC1, *Cancer magister* Cryptocyanin1; HamPHc1, *Homarus americanus* Pseudohämocyanin 1; HamPHc2, *Homarus americanus* Pseudohämocyanin 2; PinHcA bis C, *Panulirus interruptus* Hämocyanin; CmaHc6; *Cancer magister* Hämocyanin 6; CsaHc, *Callinectes sapidus* Hämocyanin; PvaHc, *Penaeus vanamei* Hämocyanin; PvuHc, *Palinurus vulgaris* Hämocyanin; PelHc1 bis 3, *Palinurus elephas* Hämocyanin; HamHcA, *Homarus americanus* Hämocyaninuntereinheit A,

## 2. Die Hämocyanine der Myriapoden

Lange Zeit nahm man an, dass die Myriapoden aufgrund ihres sehr gut ausgebildeten Tracheensystems kein respiratorisches Protein für den Transport von Sauerstoff brauchen. Die Präsenz eines 6x6 Hämocyanins bei einem Chilopoden (Hundertfüßer) dem Spinnenläufer *Scutigera coleoptrata* wurde als Ausnahme betrachtet und mit dem blind endenden Tracheensystem und der ungeheuren Schnelligkeit dieser Tiere erklärt (Mangum *et al.*, 1985, Gebauer und Markl, 1999). Vor kurzem wurde in der Arbeitsgruppe ein Hämocyanin bei einem anderen Myriapoden (*Spirostreptus spec.*) identifiziert (Jaenicke *et al.*, 1999). Es handelt sich hierbei um einen Diplopoden (Doppelfüßer), der weder über ein blind endendes Tracheensystem verfügt, noch sich durch extreme Schnelligkeit auszeichnet. Damit konnte Hämocyanin bei Vertretern beider Großgruppen gezeigt werden. Wie bei Hämocyanin von *Scutigera* handelt es sich bei *Spirostreptus*-Hämocyanin um ein 6x6 Molekül. Diese Quartärstruktur kommt bisher nur bei den Myriapoden vor. Chilopoda und Diplopoda haben sich laut Fossilfunden vor etwa 400 Millionen Jahren getrennt (Jeram *et al.*, 1990; Shear, 1997). Die beiden Myriapodenhämocyanine unterscheiden sich wesentlich in ihren Sauerstoffbindungseigenschaften. Das Hämocyanin von *S. coleoptrata* hat eine vergleichsweise geringe Sauerstoffaffinität ( $P_{50} = 55$  Torr), jedoch eine hohe Kooperativität ( $h = 8,9$ ). Bei dem Hämocyanin von *Spirostreptus* sind die Verhältnisse umgekehrt ( $P_{50} = 4,7$  Torr;  $h = 1,3$ ). Anhand dieser Daten lässt sich spekulieren, dass das Hämocyanin bei *Scutigera* eher eine Sauerstofftransportfunktion hat, während es bei *Spirostreptus* in erster Linie als Sauerstoffspeicher dient (siehe unten).

Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Hämocyaninsequenz von *Spirostreptus spec.* handelt es sich um die erste eines Diplopoden. Es ist ein Protein mit 653 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 75,5 kDa. Diese Daten stimmen mit der oberen Bande einer SDS-PAGE überein und die Sequenz wurde deshalb mit SpiHc1 benannt (siehe Abb. 25). Die Sequenz des *Spirostreptus*-Hämocyanins besitzt alle für ein sauerstofftransportierendes Hämocyanin notwendigen Aminosäuren. So sind z.B. die sechs hochkonservierten Histidine der Kupferbindungsstellen zu finden. Das Protein unterscheidet sich jedoch deutlich in seiner Sequenz, Struktur und seinen biochemischen Eigenschaften von den Phenoloxidasen und nichtrespiratorischen hämocyaninähnlichen Proteinen. Es besitzt ein typisches Nterminales Signalpeptid, das für den intrazellulären Transfer des Proteins in das endoplasmatische Retikulum notwendig ist. Den Cheliceraten fehlt dieses Signalpeptid, da das Hämocyanin dieser Tiere im Cytosol synthetisiert wird (Fahrenbach, 1970; Markl *et al.*, 1988; Markl und

Decker, 1992). Im Gegensatz dazu besitzen die Hämocyanine der Crustaceen und Insekten ein solches Signalpeptid, da das Protein im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert wird. Man kann aufgrund des vorhandenen Signalpeptids davon ausgehen, dass die Biosynthese des Hämocyanins bei *Spirostreptus* ebenfalls am rauen endoplasmatischen Retikulum und nicht an Polysomen im Cytosol stattfindet. Über den Synthesort des Hämocyanins der Diplopoden gibt es keine genauen Informationen. Eine RT-PCR mit Hämocyanin-spezifischen Primern verschiedener Gewebe von *Spirostreptus spec.* ergab Hinweise auf Hämocyanin-mRNA im Kopfbereich und in den Blutzellen. Dies muss jedoch durch genauere Analysen überprüft werden.

Die Sequenz von *Spirostreptus*-Hämocyanin besteht dennoch aus drei Domänen, wobei interessanterweise die bei den Crustaceen-Hämocyaninen vorhandene alpha-Helix 1.2 der ersten strukturellen Domäne deletiert ist (siehe Multisequenzalignment im Anhang). Diese Deletion kann man auch bei den Cheliceratenhämocyaninen beobachten. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit könnte man eine nähere Verwandtschaft der Cheliceraten und Myriapoden postulieren (vergl. Friedrich und Tautz, 1995; Hwang *et al.*, 2001). Die phylogenetische Einordnung des Myriapodenhämocyanins wird in Kapitel D 2.1 diskutiert.

Gebauer und Markl (1999) fanden beim Hämocyanin von *Scutigera coleoptrata* vier verschiedene Untereinheiten, die sie mit a, b, c und d bezeichneten. Ich selbst konnte in einer SDS-PAGE zwei distinkte Banden (A und B) identifizieren, wobei vermutlich die Untereinheiten c und d, sowie a und b comigrierten und mit den verwendeten Methoden nicht einzeln zu detektieren sind. (siehe Abb. 27).

Ich erhielt zwei distinkte Sequenzen von typischen Hämocyanin-Untereinheiten (ScoHc1 und ScoHc2) (Abb. 28 und 29). Beide besitzen ein Signalpeptid. Bei einem Vergleich der N-terminalen, durch eine Proteinsequenzierung ermittelten Sequenzen mit den cDNA-Klonen zeigte sich, dass ScoHc1 der SDS-Bande A zugeordnet werden kann. Die Sequenzen unterscheiden sich allerdings in zwei Aminosäuren. Dieser Unterschied kann mit der oben erwähnten Heterogenität der Untereinheiten zusammenhängen. Die SDS-Bande B konnte dagegen der Untereinheit ScoHc2 nicht zugewiesen werden (siehe C2.2.2). Man kann also von mindestens drei verschiedenen Sequenzen ausgehen, wobei, wie erwähnt, immunbiochemisch vier distinkte Untereinheiten identifiziert werden konnten (Gebauer und Markl, 1999). Die beiden sequenzierten Hämocyaninuntereinheiten von *S. coleoptrata* zeichnen sich ebenfalls durch hochkonservierte Aminosäuren im Bereich der Kupferbindungsstellen als echte Sauerstofftransportproteine aus (Abb. 38).

## 2.1 Phylogenie des Myriapoden-Hämocyanins

Die phylogenetische Stellung der Myriapoda im Stammbaum der Arthropoda ist vor allem seit Anfang der neunziger Jahren umstritten. Aufgrund ihres Tracheensystems wurden sie von den meisten Autoren von etwa 1935 bis 1991 mit den Insecta in die Überklasse „Tracheata“ gestellt (Snodgrass, 1938; Brusca und Brusca, 1990). Andererseits gab es morphologische Merkmale, die dieser Hypothese widersprachen und eine Monophylie dieser beiden Klassen wurde bereits früh auf das Heftigste abgelehnt (Börner, 1909). Neuere Sequenzdaten und vergleichend-entwicklungsbiologische Untersuchungen lieferten jedoch immer stärkere Hinweise, dass die „Tracheata“ als monophyletische Gruppe nicht existieren (Turbeville *et al.*, 1991; Averof und Akam, 1995; Friedrich und Tautz, 1995; Dohle, 1997; Giribet und Ribera, 2000; Shultz und Regier, 2000; Hwang *et al.*, 2001; Giribet *et al.*, 2001; Regier und Shultz, 2001). Die Hexapoda wären nach diesen Befunden eher mit den Crustacea verwandt. Es gibt sogar ein „Pancrustacea“-Konzept (García-Machado *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000; Burmester, 2001; Regier und Shultz, 2001), d.h., die Insecta würden sich innerhalb der dementsprechend paraphyletischen Crustacea anordnen. Die phylogenetische Stellung der Myriapoda wird allerdings in keiner dieser Arbeiten zuverlässig aufgelöst und es gibt verschiedene Evolutionsmodelle, die diskutiert werden können (Abb. 41). In eigenen phylogenetischen Untersuchungen bildeten die Hämocyanine von *Spirostreptus* und *Scutigera* einen gemeinsamen Ast mit Bootstrap-Werten von 61% bzw. 99%, wobei die Auftrennung in distinkte Untereinheiten bereits vor der Trennung der Chilopoden und Diplopoden erfolgte. (Abb. 30 und 31). Dies sowie das gemeinsame 6x6 Hämocyanin kann als ein weiteres Argument für die Monophylie der Myriapoda genommen werden und steht in klarem Widerspruch zu Vorstellungen einer Paraphylie der Myriapoda (Kraus, 1998), selbst wenn Daten in Bezug auf die Pauropoda und Symphyla noch fehlen. SpiHc1 von *Spirostreptus* gruppiert stets mit ScoHc1 von *Scutigera*. Die beiden Untereinheiten zeigen eine Sequenzidentität von 50,5%. Die andere Hämocyaninuntereinheit ScoHc2 von *S. coleoptrata* hat nur 44,6% Sequenzidentität mit SpiHc1 und zweigt früher im Stammbaum ab (Abb. 30 und 31). Die Position der Myriapodenhämocyanine im Stammbaum zueinander ist mit einer hohen statistischen Wahrscheinlichkeit gesichert (Abb. 30 und 31; ScoHc2: 100%; SpiHc1/ScoHc1: 47 und 84%). Es war jedoch anhand der Hämocyanin-Sequenzen nicht genau möglich die phylogenetische Stellung der Myriapoda relativ zu den anderen Großgruppen der Arthropoden zu zeigen. Berechnungen mit der „Neighbor Joining“ Methode favorisieren ein Schwestergruppenverhältnis der Myriapoda mit den Crustacea. Dieses Ergebnis wäre

ganz im Sinne der „Mandibulata“-Hypothese, wonach die Insecta, Crustacea und Myriapoda ein gemeinsames Taxon der Arthropoda bilden (Abb. 41D) (morphologisches Merkmal wären hier die hochentwickelten Kiefer – Mandibeln – dieser Tiere) (Brusca und Brusca, 1990). Diese Daten entsprechen denen von ribosomaler DNA (Turbeville *et al.*, 1991; Giribet und Ribera, 2000) oder anderen molekularen Studien (Regier und Shultz, 1997; Shultz und Regier, 2000). Berechnungen mit der „Maximum Parsimony“-Methode sprechen jedoch eher für ein Schwestergruppenverhältnis der Myriapoda mit den Chelicerata (Abb. 41C) wie sie auch Friedrich und Tautz (1995) aufgrund von Daten der mitochondrialen DNA postulieren. Im Sequenzvergleich besteht die größte Ähnlichkeit mit den Cheliceratenhämocyaninen (39-45% Identität, gegenüber 28,8-34,1% Identität mit Crustaceen und 32-37,6% Identität mit Insekten) (siehe Tab. 2). Obwohl es keine starken morphologischen Hinweise darauf gibt, muss man aus diesen Gründen einen gemeinsamen Ursprung der Chelicerata und Myriapoda ernsthaft annehmen. Neueste Untersuchungen mitochondrialer Proteinsequenzen stützen diese Hypothese (Hwang *et al.*, 2001). Die phylogenetischen Zusammenhänge der Arthropodenevolution werden weiter unten noch ausführlich diskutiert (siehe D 4). Aufgrund dieser Ergebnisse kann man aber auf jeden Fall postulieren, dass die Tracheata (Abb. 41A) mit großer Wahrscheinlichkeit nicht existieren.

### 3. Hämocyanin bei den Onychophora (Stummelfüßer)

Onychophora werden meist als Proarthropoda angesehen, wobei ihre genaue Stellung im Stammbaum der Arthropoda umstritten ist. Es wurde lange angenommen, dass bei den Onychophora, ähnlich wie bei den Myriapoda, aufgrund ihres gut ausgebildeten Tracheensystems ein respiratorisches Protein in der Hämolymphe überflüssig sei (Ellerton *et al.*, 1983). Erst durch die hier durchgeführten Untersuchungen konnte ein Hämocyanin nachgewiesen werden, womit auch zum ersten Mal die Existenz eines Arthropodenhämocyanins außerhalb der Euarthropoda belegt wurde. Es wurden uns einige Exemplare von *Epiperipatus spec.* von Frau Dr. H. Ruhberg (Universität Hamburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Untersuchung der Hämolympheproteine gestaltete sich zunächst schwierig, da die Entnahme der Hämolymphe aufgrund der weichen Haut der Tiere und der geringen Menge an Blut äußerst diffizil war. Auch ist die Hämocyaninkonzentration im Blut äußerst gering (etwa 5 bis 10 % der Gesamtproteinkonzentration, die mit 10 bis 20 mg/ml ebenfalls gering ist). Daher ist es uns bisher nicht gelungen, Hämocyanin in ausreichender Menge zu reinigen, um weitergehende Experimente wie z.B. die Aufnahme von Sauerstoffbindungskurven zu ermöglichen. Auch konnte aufgrund der geringen Menge an Hämolymphe kein spezifischer Antikörper gegen Hämocyanin hergestellt werden. Tests auf eine Phenoloxidaseaktivität des Proteins, die am Institut für molekulare Biophysik durchgeführt wurden, hatten ein negatives Ergebnis (siehe C3.2, Abb.33). Ich konnte jedoch die cDNA des Hämocyanins von *Epiperipatus spec.* klonieren. Es weist alle typischen Motive eines „echten“ Hämocyanins auf. Interessanterweise fehlt beim Onychophoren-Hämocyanin, ähnlich dem der Cheliceraten, ein Signalpeptid, welches für den Transmembrantransport zuständig wäre. Dies lässt vermuten, dass es ebenfalls an freien Ribosomen synthetisiert und dann durch ein Aufplatzen der blutbildenden Zellen, den Cyanocyten, freigesetzt wird (Kempter, 1983; Markl *et al.*, 1990). Über all diese Mechanismen ist jedoch nur eine Spekulation möglich, da es zum Hämocyanin der Onychophoren bisher keine weiteren biochemischen oder histologischen Daten gibt. Bei einem Vergleich der Sequenzen der Hämocyanine anderer Arthropoden ergab sich die höchste Ähnlichkeit mit denen der Cheliceraten (EcaHcA: 38,8%, LpoHc2: 40,8%), wohingegen geringere Übereinstimmungen mit den Hämocyaninen der Myriapoden (SpiHc1: 34,4%, ScoHc1: 36,2%, ScoHc2: 36,1%), Crustaceen (HamHcA: 32,3%, PelHc1: 34,3%, PelHc2: 33,3%, PelHc3: 33,8%) und Insekten zu beobachten waren (SamHc: 34,6%). Die Phenoloxidasen zeigen eine Übereinstimmung von 37% (PlePPO) (Sequenzidentitäten siehe Tab. 2). Trotz der relativ hohen Sequenzähnlichkeit des Onychophorenhämocyanins mit der

Phenoloxidase sprechen alle anderen Merkmale des Proteins für ein „echtes“ Hämocyanin.

### 3.1 Die Evolution des Hämocyanins der Onychophora

Die phylogenetische Stellung der Onychophoren in Bezug auf die Arthropoden ist von großem Interesse, da sie oft als „missing link“ zwischen Anneliden und Arthropoden und als lebendes Fossil bezeichnet wurden (Wenzel, 1950; Ghiselin, 1984). Die Fossilien reichen bis in das Kambrium zurück (Hou und Bergström, 1995). Durch 16S (Ballard *et al.*, 1992) und 18S-DNA-Sequenzen (Aguinaldo *et al.*, 1997; Giribet und Ribera, 1998), bzw. der Anordnung der mitochondrialen Gene (Boore *et al.*, 1995) kam es zu keiner zufriedenstellenden und zuverlässigen Auflösung der phylogenetischen Stellung der Onychophora. Erst neuere Ergebnisse von Regier und Shultz (2001), die kernkodierte Sequenzen verwendeten (Elongationsfaktor 1 $\alpha$  und DNA-Polymerase II), sind vergleichbar mit den Ergebnissen, die mit Hämocyanin ermittelt wurden. Bei einer phylogenetischen Analyse des *Epiperipatus*-Hämocyanins und anderer Arthropodenhämocyanine sowie Phenoloxidasen mit der Distanzmatrix-orientierten „Neighbor Joining“-Methode steht das Onychophorenhämocyanin eindeutig an basaler Position in einem Schwestergruppenverhältnis zu allen anderen Arthropoda (Abb. 35). Dies kann man als eine starke Stütze des Proarthropoda-Konzepts ansehen.

Bei Verwendung der „Maximum Parsimony“-Methode wurden die Onychophora als Schwestergruppe der Myriapoda und Chelicerata eingeordnet (Abb. 36). Diese Gruppierung kann jedoch als Beispiel für eine „long branch attraction“ diskutiert werden. Dabei handelt es sich um ein Phänomen, das vor allem bei Verwendung der „Maximum Parsimony“ Methode auftaucht, wenn Sequenzen analysiert werden, die unterschiedlich schnell evolvieren. Die „Maximum Parsimony“-Methode tendiert dazu, alle langen Äste eines Stammbaums zu bündeln (Felsenstein, 1978).

#### 4. Evolution der Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoden

Die Mitglieder der Hämocyaninsuperfamilie zeichnen sich alle durch große Übereinstimmungen ihrer Tertiär-, sowie Quartärstrukturen aus. Man geht davon aus, dass sie alle einen gemeinsamen Vorfahren haben und dass sie sich seit ihrer Trennung differenziert haben (Markl und Decker, 1992; Burmester, 2001). Der älteste Verzweigungspunkt der Hämocyaninsuperfamilie ist wohl der zwischen den respiratorischen Hämocyaninen und den sauerstoffumsetzenden Phenoloxidasen. Beide weisen starke strukturelle Ähnlichkeiten auf und es scheint möglich, dass eine Phenoloxidase im Laufe der Evolution in ein Sauerstofftransportprotein umgewandelt wurde (Markl und Decker, 1992; Burmester, 2001). Bei einem Alignment verschiedener Hämocyanine und Prophenoloxidasen kann man erkennen, dass die Aminosäuren der beiden Kupferbindungsstellen absolut konserviert sind. Das gilt nicht nur für die Histidine, die einen wesentlich Anteil an der Bindung des Sauerstoffs haben, sondern auch für viele andere Bereiche (Abb. 38). Das lässt den gemeinsamen Ursprung der Hämocyanine und Prophenoloxidasen erahnen. Auch die hexamere Grundstruktur ist bei allen Arthropodenhämocyaninen gut konserviert und zweifellos ging die Evolution der Arthropodenhämocyanine von einem Hexamer aus. Die Bildung von Oligo-Hexameren entwickelte sich bei Crustaceen, Cheliceraten und Myriapoden wahrscheinlich unabhängig voneinander (Markl und Decker, 1992; van Holde und Miller, 1995; Burmester, 2002). Während bei den Crustacea und Chelicerata die Struktur des Hämocyanins von 1x6 bis 1x8 Untereinheiten variiert, scheint bei den Myriapoda die 6x6 Struktur einheitlich zu sein. Man kann annehmen, dass diese Struktur seit der Aufspaltung der Diplopoda und Chilopoda vor mindestens 400 Millionen Jahren (Robinson, 1990; Friedrich und Tautz, 1995; Shear, 1997) konserviert ist.



## CuA-Bindungsstelle

```

PlePPO : VSYWREDFGINSHHWHWHLVYPIEM-----NVNDRKGELFFYYMHQQMVARVD
PmoPPO : ISYWREDFGINVHHWHWHLIYPPAM-----GFDRDRKGELFFYYMHQQVIARYD
OnyHc   : LSYFREDIAINSHHWHWHLIYVPGS-NPS-DKKINRKGELFFYYMHEQMLARYD
EcaHcB  : LAYYREDIGVNAHHWHWHLVYPATWRPEVVHRIKDRKGELFFYYMHQQMCARYD
SpiHc   : VDYFTEDLGMNSHHYHWHVLIHPSIWTQDI-G-EKSKLKGELFFYYMHRQMVARFD
ScoHc1  : LSYFLEDIGMNSHHYHWHVVIHPAVWLPKH-GPRKDRKGELFFYYMHQMVARYD
ScoHc2  : LLYFLEDLGMNSHHHWHVVIHPAIWLPKH-GGVKDRKGELFFYYMHKQMVARVD
HamHcA  : VAYFGEDIGLNIHHVTWHMDFPFWWKDSY-GYHIDRKGELFFWVAHHQLTVRFD
PelHc1  : VAYFGEDIGMNIHHVTWHMDFPFWDDSY-GYHIDRKGELFFWVHHQLTARFD
PelHc2  : VAYFGEDIGMNIHHVTWHMDFPFWQDSY-GYHIDRKGELFFWVHHQLTARFD
PelHc3  : VAYFGEDIGMNIHHVTWHMDFPFWDDSY-GYHIDRKGELFFWVHHQLTARFD
SamHc   : VAYLGEDLGMNSHHSQWHMDFPFWWKEDEYGIKNERKGELFFYYMHQQLTARFD

```

## CuB-Bindungsstelle

```

PlePPO : GDLHNTGHVLLAFCHDNDNSHREEI GVMGDSATALRDPVFYRWHKFDLDFQ
PmoPPO : GDLHNRGHDI LAFSHDPDNNAHKEEMGVVGLGTSLRDPVFFRLHKLVDLDFQ
OnyHc   : GDLHNTGHVMLATAHDPDKRFNSSDGVMGFVQTALRDPVFYRWHKHIDNLLQ
EcaHcB  : GSLHNWGHVIMS AVDDP DGRYQLNE GVMGDSATALRDPVFYRWHRFIDDMFQ
SpiHc   : GNLHNSYAHVIAAR IADS DGEHMEDNGAMYDVAT SARDP LFYSW HKFIDKLFT
ScoHc1  : GNIHCYAHVMAAR IADP DGRYGEDNGVMHDVAT SARDP LFYSW HKFIDNIFL
ScoHc2  : GNLHCYAHVIAAGKVTDPQSTYGEKNGAMYDVAT SARDP LFYSW HKFIDNIFQ
HamHcA  : GALHNTAHIMLGRQGDPHGKFNMPF GVMEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFK
PelHc1  : GSLHNTAHMMLGRQGDPHGKFDMPF GVMEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFK
PelHc2  : GSLHNTAHMMLGRQGDPHGKFDMPF GVMEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFK
PelHc3  : GSLHNTAHMMLGRQGDPHGKFNMPF GVMEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFK
SamHc   : GALHNYGHIMLGQITDPKRKFNMPF GVMEHFETATRDPAFFRLHKYLDNLFY

```

**Abb. 38: Kupferbindungsstellen der Hämocyanine und Phenoloxidasen verschiedener Arthropoden.**

Die konservierten Bereiche sind wie folgt farbig unterlegt : rot = 100%, blau = 75 % und grün = 50% konserviert. PlePPO, *Pastifastacus leniusculus* Prophenoloxidase; PmoPPO, *Penaeus monodon* Prophenoloxidase; OnyHc, *Epiperipatus spec.* Hämocyanin; EcaHcB, *Eurypelma californicum* Hämocyanin a; SpiHc1, *Spirostreptus spec.* Hämocyanin 1; ScoHc1 und 2, *Scutigera coleoptrata* Hämocyanin 1 und 2, HamHcA, *Homarus americanus* Hämocyanin A, PelHc1 bis 3, *Palinurus elephas* Hämocyanin, SamHc, *Schistocerca americana* Hämocyanin.

In einer Ähnlichkeitsanalyse wurden einige Sequenzen von Hämocyaninen und Phenoloxidasen mit dem Programm ClustalX paarweise miteinander verglichen und die Identitäten in Prozent berechnet. Dabei kann man sehen, dass die Hämocyanine mit Phenoloxidasen etwa 30-40% Sequenzidentität besitzen. Betrachtet man die Primärstrukturen der Myriapoda, so kann man feststellen, dass SpiHc1 eine größere Ähnlichkeit mit ScoHc1 aufweist als mit ScoHc2 (50,5 respektive 44,6% Identität). Die Äste gruppieren sich auch dementsprechend im Stammbaum (Abb. 30 und 31). Betrachtet man die Sequenzähnlichkeiten der Myriapoden-Hämocyanine mit anderen Arthropoden-Hämocyaninen, fällt auf, dass es bis 42% identisch mit den Cheliceraten-Hämocyaninen ist, mit dem Insekten Hämocyanin jedoch nur etwa 35%. Innerhalb der drei Hämocyanin-Sequenzen der Languste *Palinurus elephas* herrscht eine Übereinstimmung von 94 bis 96%, wobei mit der nahe verwandten Languste *Panulirus interruptus* nur eine Identität von ca. 80% besteht. Das Insekten-Hämocyanin besitzt deutlich mehr Identitäten mit den Hämocyaninen der Crustaceen als mit jenen Arthropoden oder mit den Prophenoloxidasen.

Anhand dieser Übereinstimmungen in der Struktur der Hämocyanine und Prophenoloxidasen kann man von einem gemeinsamen Ursprung dieser Proteine ausgehen.

	PlePPO	OnyHc	EcaHcA	LpoHc2	SpiHc1	ScoHc1	ScoHc2	HamHcA	PinHcB	PinHcA	PelHc1	PelHc2	PelHc3	PinHcC	SamHc
<b>PlePPO</b>		37	40,1	39,8	32,7	36,4	33,4	30,2	30,1	29,1	30,2	30,5	30,3	28,3	31,5
<b>OnyHc</b>	37		38,8	40,8	34,4	36,2	36,1	32,3	32,5	32,8	34,3	33,3	33,8	31	34,6
<b>EcaHcA</b>	40,1	38,8		60,7	39,2	42,9	38,9	36,3	32,3	32,8	33,8	33,7	33,1	32,6	36,5
<b>LpoHc2</b>	39,8	40,8	60,7		39,2	44,9	41,1	35,8	34,1	34,3	35	34,6	33,8	33,2	37,8
<b>SpiHc1</b>	32,7	34,4	39,2	39,2		50,5	44,6	29,3	29,5	29,9	29,3	29,1	28,8	29,7	32
<b>ScoHc1</b>	36,4	36,2	42,9	44,9	50,5		52,4	33,4	33,1	33,5	34,1	33,3	33,2	31,7	37,6
<b>ScoHc2</b>	33,4	36,1	38,9	41,1	44,6	52,4		34,1	32	31,9	31,7	31,1	31,4	31,8	33,6
<b>HamHcA</b>	30,2	32,3	36,3	35,8	29,3	33,4	34,1		68,9	68,5	67,8	67,2	67,5	58,7	45,2
<b>PinHcB</b>	30,1	32,5	32,3	34,1	29,5	33,1	32	68,9		97	81,1	80,3	80,5	59,5	43,7
<b>PinHcA</b>	29,1	32,8	32,8	34,3	29,9	33,5	31,9	68,5	97		80,5	79,9	79,8	59,8	44
<b>PelHc1</b>	30,2	34,3	33,8	35	29,3	34,1	31,7	67,8	81,1	80,5		94,4	96,2	60,2	43,6
<b>PelHc2</b>	30,5	33,3	33,7	34,6	29,1	33,3	31,1	67,2	80,3	79,9	94,4		94,3	61	43
<b>PelHc3</b>	30,3	33,8	33,1	33,8	28,8	33,2	31,4	67,5	80,5	79,8	96,2	94,3		60	43
<b>PinHcC</b>	28,3	31	32,6	33,2	29,7	31,7	31,8	58,7	59,5	59,8	60,2	61	60		43,6
<b>SamHc</b>	31,5	34,6	36,5	37,8	32	37,6	33,6	45,2	43,7	44	43,6	43	43	43,6	

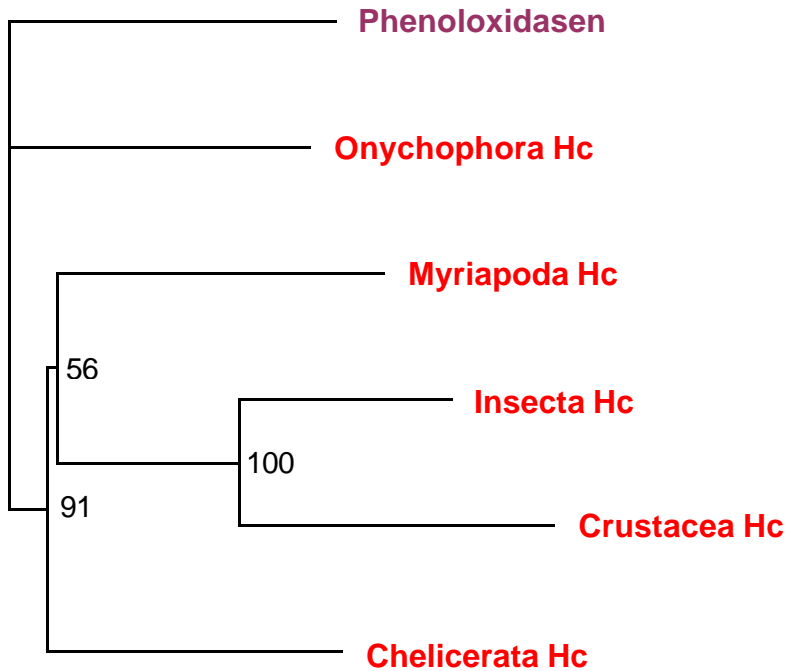
**Tab. 2: Sequenzidentitäten (%) der Primärstrukturen verschiedener Hämocyane und Prophenoloxidasen der Arthropoda.** PlePPO, *Pastifastacus leniusculus* PPO; OnyHc, *Epiperipatus spec.* Hämocyanin; EcaHcA, *Eurypelma californicum* Hämocyanin; SamHc, *Schistocerca americana* Hämocyanin; LpoHc2, *Limulus polyphemus* Hämocyanin; ScoHc1 und 2, *Scutigera coleoptrata* Hämocyanin; SpiHc1, *Spirostreptus spec.* Hämocyanin; PinHcA, B und C, *Panulirus interruptus* Hämocyanin C; HamHcA, *Homarus americanus* Hämocyanin A; PelHc1-3, *Palinurus elephas* Hämocyanin.

## 5. Molekulare Phylogenie der Proteine der Hämocyaninsuperfamilie

Betrachtet man die Evolution eines Proteins, so kann man daraus Rückschlüsse auf die Evolution des Tieres ziehen, denn die Funktion eines Proteins und die Anpassungen auf molekularer Ebene spiegeln die Veränderungen der gesamten Spezies wieder. Man kann dementsprechend sagen, dass die Proteine eines Organismus dessen phylogenetische Geschichte teilen und physiologische Anpassungen während der Evolution auf Veränderungen der Proteinsequenzen zurück gehen. Die Methoden der molekularen Phylogenie haben in letzter Zeit sehr zum Verständnis, sowohl der Systematik der Tiere, als auch der Evolution und Funktion der Proteine beigetragen (z.B. Swofford *et al.*, 1995; Pagel *et al.*, 1999). Dayhoff *et al.* (1975) postulierten, dass Proteingruppen, die einen gemeinsamen Vorfahren haben in Familien und Superfamilien zusammengefasst werden können. Es ist möglich mit den Sequenzen orthologer Proteine einen phylogenetischen Stammbaum zu erstellen. Nimmt man eine molekulare Uhr an, d.h. die Evolutionsrate eines Proteins oder einer Proteinfamilie ist durchgehend konstant, kann man Aussagen über den Zeitpunkt bestimmter Aufspaltungseignisse in einem solchen Stammbaum treffen.

In einer Analyse aller bekannten Sequenzen von Arthropodenhämocyaninen und Prophenoloxidasen in die auch sämtliche Ergebnisse dieser Arbeit miteinbezogen wurden, wurden die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Hämocyaninsuperfamilie untersucht. Da eine externe Außengruppe fehlt, wurde der Stammbaum nach Burmester (2001) mit den Phenoloxidasen gewurzelt. Jedes andere Konzept der Evolution der Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoda würde eine mehrfache und unabhängige Entstehung von Hämocyaninen und Phenoloxidasen zugrunde legen, was jedoch ziemlich unwahrscheinlich ist. Viel eher ist ein monophyletischer Ursprung dieser Proteine anzunehmen (Burmester, 2001). In dem hier gezeigten und vereinfachten Stammbaum stehen die Onychophora an basaler Position in einem Schwestergruppenverhältnis zu allen anderen Arthropoden. Ein Schwestergruppenverhältnis der Insecta und Crustacea ist mit einem Bootstrap-Wert von 100 gut unterstützt (Abb. 39) (Brusca und Brusca, 1990; Friedrich und Tautz, 1995; Dohle, 1997). Die genaue phylogenetische Position der Myriapoda kann jedoch nicht aufgelöst werden. Sie stehen entweder in einem Schwestergruppenverhältnis zu den Cheliceraten oder man findet sie, wie in Abb. 39 dargestellt und mit einem Bootstrap-Wert von 56% relativ gut statistisch abgesichert, als Schwestergruppe der Crustacea + Insecta („Mandibulata“-Hypothese) (Abb. 30 und 31). Anhand der vorliegenden Daten

kann jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit die Monophylie der Myriapoda und Insecta ausgeschlossen werden, was die „Tracheata“-Hypothese widerlegt.

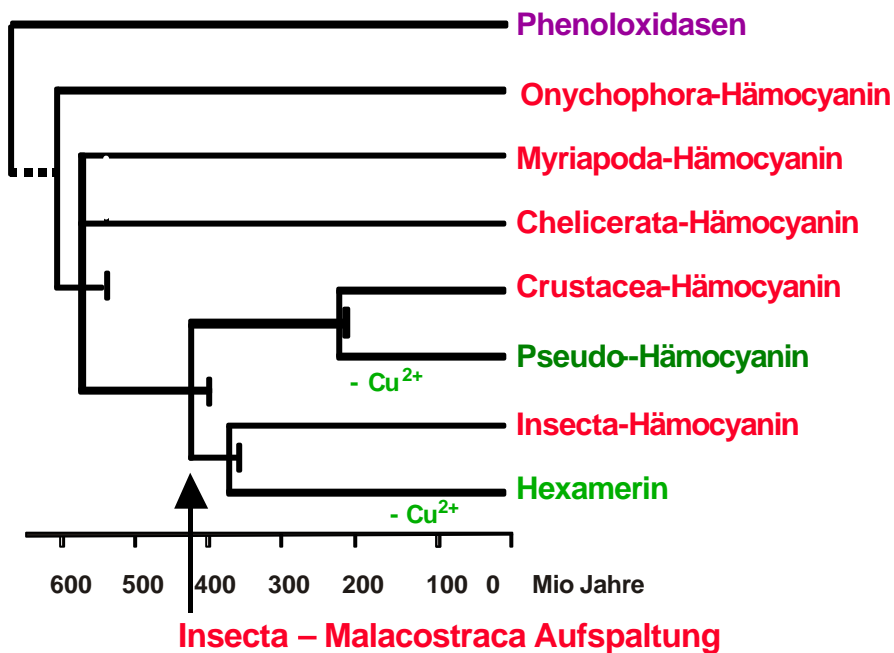


#### 0.1

#### **Abb. 39: Vereinfachte Darstellung der molekularen Phylogenie der Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoda**

Stammbaum nach der „Neighbor Joining“ Methode. Es wurden 34 Hämocyanin-, bzw. Phenoloxidasesequenzen verwendet. Die Zahlen an den Verzweigungspunkten der Äste geben die „Bootstrap“-Unterstützungswerte an.

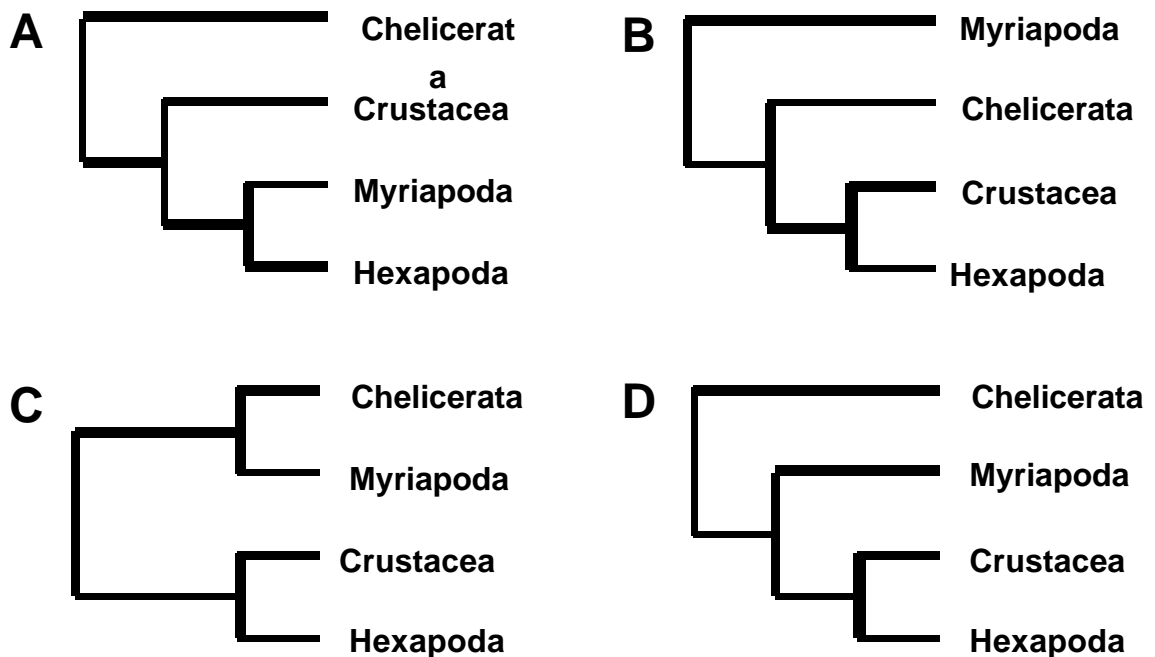
Unter der Annahme einer molekularen Uhr kann man davon ausgehen, dass sich die Cheliceraten- und die Crustaceenhämocyanine vor 600 Millionen Jahren voneinander trennten, mit der Aufspaltung der Arthropodenunterstämme (Abb. 40). Man kann also vermuten, dass die Evolution der Hämocyanine gemäß der Phylogenie der Arthropodenunterstämme erfolgte (Burmester, 2001).



**Abb. 40: Zeitskala der Evolution der Hämocyaninsuperfamilie**

Der vereinfachte linearisierte Stammbaum wurde auf der Basis von Proteindistanzen berechnet und mit paläontologischen Daten geeicht. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Die phylogenetische Stellung der Myriapoda ist nicht gesichert.

Je nach verwendeter Methode existieren alternative Modelle zur Arthropodenevolution (Abb. 41). Die Evolutionmodelle B bis D entsprechen Hypothesen, die alle in Betracht zu ziehen sind. In Abb. 41 Modell B stehen die Myriapoda basal zu allen anderen Euarthropoda (Ballard *et al.*, 1992). In Abb. 41 C sind die Myriapoda als Schwestergruppe der Chelicerata eingeordnet (Friedrich and Tautz, 1995; Giribet *et al.*, 1996) und Modell Abb. 41 D postuliert ein Schwestergruppenverhältnis der Myriapoda mit den Hexapoda und Crustacea (Pancrustacea). Diese phylogenetische Position stimmt mit der „Mandibulata“-Hypothese überein. (Boore *et al.*, 1995; Regier und Shultz, 1992). Das in Abb. 41 A dargestellte „Tracheata“ Modell der Arthropodenevolution kann wohl ausgeschlossen werden. Alle hier gezeigten Evolutionsmodelle müssen auch in Zukunft weiter diskutiert werden. Aufgrund der vorliegenden Daten scheint jedoch deutlich geworden zu sein, dass die Onychophoren an basaler Position im Arthropodenstammbaum stehen und die Insekten mit den Crustaceen eine Schwestergruppe bilden, wobei hier die „Pancrustacea“- und „Mandibulata“-Konzepte in Erwägung gezogen werden müssen.



**Abb. 41: Vier Modelle der Arthropodenevolution**

(A) Klassisches Modell. Myriapoda und Insecta bilden die „Tracheata“ (Brusca und Brusca, 1990)

(B) Myriapoda stehen basal zu allen anderen Euarthropoda (Ballard *et al.*, 1992)

(C) Myriapoda sind die Schwestergruppe der Chelicerata (Friedrich and Tautz, 1995; Giribet *et al.*, 1996)

(D) Myriapoda sind die Schwestergruppe der Pancrustacea (Hexapoda und Crustacea) (Boore *et al.*, 1995; Regier and Shultz, 1992)

## 6. Ausblick

Auch wenn durch die hier vorliegenden Daten zur Aufklärung der Struktur und Evolution des Hämocyanins der Arthropoda beigetragen werden konnten, so sind doch noch zahlreiche Fragen offen. Innerhalb der Crustacea wären vor allem molekulare Daten zu nicht-dekapoden Malakostraken interessant (siehe Yager, 1991; Hodgson and Spicer, 2001) und es fehlen Sequenzdaten der  $\beta$ -Untereinheit, die zum besseren Verständnis der Evolution und Diversität der Hämocyaninuntereinheiten der Crustaceen beitragen könnten. Auch die Untersuchung weiterer Großgruppen der Myriapoda (Symphyla und Pauropoda) könnte deren phylogenetische Stellung klären. Ebenso wichtig wäre eine Identifizierung weiterer Mitglieder der Hämocyaninsuperfamilie, wie die eventueller Prophenoxidasen der Myriapoda bzw. Onychophora. Neben der Abklärung der Großgruppenverhältnisse könnte man sich vermittels Hämocyaninsequenzen der Stammesgeschichte innerhalb einzelner Gruppen wie beispielsweise der Spinnen oder der brachyuren Krabben zuwenden.



## **E. Zusammenfassung**

In vielen Arthropoden wird Sauerstoff mittels des als Oligo-Hexamer vorliegenden Kupferproteins Hämocyanin transportiert. In der vorliegenden Arbeit wurde das Hämocyanin einiger Vertreter der Arthropoden biochemisch und molekularbiologisch untersucht. Dazu wurden cDNA-Expressionsbanken eines Hummers (*Homarus americanus*), einer Languste (*Palinurus elephas* = *Palinurus vulgaris*), eines Diplopoden (*Spirostreptus spec.*), eines Chilopoden (*Scutigera coleoptrata*) und eines Onychophoren (*Epiperipatus spec.*) erstellt und mit Antikörpern nach Hämocyanin durchsucht. Bei *H. americanus*, *P. elephas* und *S. coleoptrata* konnten mit dieser Methode bisher unbekannte Hämocyaninuntereinheiten vollständig sequenziert werden. Bei den Crustaceen konnten vier Untereinheiten isoliert werden, bei denen es sich um Hämocyanine des  $\alpha$ -Typs handelt. Bei *S. coleoptrata* wurden zwei unterschiedliche Untereinheiten gefunden. Die Hämocyaninsequenz von *Spirostreptus spec.* wurde durch eine RT-PCR und ein anschließendes 5'-RACE vervollständigt. Erst seit einiger Zeit ist das Hämocyanin bei Myriapoden biochemisch charakterisiert und bei den in diesen Untersuchungen ermittelten Hämocyaninsequenzen von *Spirostreptus spec.* und *S. coleoptrata* handelt es sich um die ersten von Myriapoden. Bei *Epiperipatus spec.* wurde mittels RT-PCR ein cDNA-Fragment des Hämocyanins amplifiziert und mit Sondenscreening ein kompletter Hämocyaninklon aus der cDNA-Bank isoliert werden. Hier handelt es sich um den ersten Hinweis, dass Onychophoren über ein respiratorisches Protein verfügen. In einer phylogenetischen Analyse der Hämocyaninsequenzen konnte ein Stammbaum der Hämocyaninsuperfamilie erstellt werden. Innerhalb der Crustacea ordnen sich die verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Typ) in distinkten Ästen an. Die Hämocyanine der Myriapoda bilden einen gemeinsamen Ast, wobei die Auftrennung in distinkte Untereinheiten bereits vor der Trennung der Chilopoden und Diplopoden erfolgte. Jedoch kann anhand der Hämocyaninsequenzen die phylogenetische Stellung der Myriapoda nicht zuverlässig aufgelöst werden. Eine gemeinsame Anordnung mit den Hexapoda („Tracheata“-Hypothese) kann jedoch mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Onychophora stehen in diesem Stammbaum an basaler Position und können somit als Proarthropoda angesprochen werden.

## F. Anhang

### 1. Verwendete Abkürzungen

AauHc	<i>Androctonus australis</i> Hämocyanin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar
CmaHc	<i>Cancer magister</i> Hämocyanin
Csa Hc	<i>Callinectes sapidus</i> Hämocyanin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
dCTP	2'-Desoxy-Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DS	Downstream
dTTP	2'-Desoxy-Thymidintriphosphat
EcaHc	<i>Eurypelma californicum</i> Hämocyanin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid)
g	Erdbeschleunigung
GITC/GTC	Guanidinthiocyanat
HamHcA	<i>Homarus americanus</i> Hämocyanin A
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> Odest.	Destilliertes Wasser
Hc	Hämocyanin
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-Thio-β-D-Galactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LpoHc	<i>Limulus polyphemus</i> Hämocyanin
MCS	Multiple cloning site
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure Natriumsalz
MMLV-RT	Moloney murine leukemia virus Reverse Transkriptase
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NRP	Nichtrespiratorisches Protein
OD	Optische Dichte
OnyHc	<i>Epiperipatus</i> Hämocyanin (Onychophora)
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PeHc	<i>Palinurus elephas</i> Hämocyanin
pfu	Plaque forming units
PinHc	<i>Panulirus interruptus</i> Hämocyanin
PvaHc	<i>Pennaeus vanamei</i> Hämocyanin
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SamHc	<i>Schistocerca americana</i> Hämocyanin
ScoHc	<i>Scutigera coleoptrata</i> Hämocyanin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SpiHc	<i>Spirostreptus spec.</i> Hämocyanin
STE	Natrium-Tris-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS/TBST	Tris buffered saline/Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TEN	Tris-EDTA-NaCl
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
TtrHc	<i>Tachypleus tridentatus</i> Hämocyanin
UE	Untereinheit

US	Upstream
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoloyl- $\beta$ -D-Galactosid

## 2. Abkürzungscodes der Aminosäuren

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

## 3. IUPAC-Codes für degenerierte Nukleotide

<b>M</b>	<b>A</b> oder <b>C</b>
<b>R</b>	<b>A</b> oder <b>G</b>
<b>W</b>	<b>A</b> oder <b>T</b>
<b>S</b>	<b>C</b> oder <b>G</b>
<b>Y</b>	<b>C</b> oder <b>T</b>
<b>K</b>	<b>G</b> oder <b>T</b>
<b>N</b>	alle vier Nukleotide
<b>B</b>	nicht <b>A</b>
<b>D</b>	nicht <b>C</b>
<b>H</b>	nicht <b>G</b>
<b>V</b>	nicht <b>T</b>

## 4. Verwendete Primer

### 4.1 Degenerierte Primer

Bezeichnung	Sequenz (in 5' - 3'Richtung)
CGW1	GGC CAN CCR CAR TGR CA
CGW-Ony	CAT RTG NTG NGG CCA NCC RCA
CuA-1	CAY GAY TGG CAY TGG CAY YTN GTN TAY CC
CuA2	CAY CAY TAY CAY TGG CA
CuA-2	CAY CAY TGG CAY TGG CA
CuACr-2	CAY CAY GTN ACN TGG CAY ATG
CuACr-3	ATG GAN TTY CCN TTY TGG TGG
CuA-D	CAY CAY TGG CAY TGG CAY
CuA-YM	TAY ATG CAY CAR CAR ATG TG
CuB-1	ACR TGN CCC CAR TTR TG
CuBCr-1	AAR ATR TTR TCC ATR TAY TTR TGN ARN CKR AAR AA
CuBCr-2	AAR ATR TTR TCC ATR TAY TTR TG
FFW2	TTY TTY TGG GTN CAY CAY CAR C
GELF-Ony	GGN GAR YTN TTY TWY TAY ATG CA
GTH	CCR CAY TGN GCR TGN GTN
GYP1	CYR TCR AAN GGR WAN CC
MG-1	CKR TCR AAN GGR WAN CCC AT
PCuA2	CAY CAY GTN CAN TGG CAY ATG G
TFF	TAY TGR AAY TCR TCR AAR AAN GT
VHH	TCR TGR TGY TCN ARR TGR TGN AG

## 4.2 Spezifische Primer

14.2	CTT TGA GAC TGC CAC CCG C
312.1 T3	TCT TCG GTG ACT GTT CCT G
312.1 T7	CAG GAA CAG TCA CCG AAG A
321.1	CTT GTA GAA CTT GTC CAT C
612.1	ACC TCC ACT CTA CGA AAT C
CT 5'PCR Primer	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT
Ony 1	GAT GGA TAC TTT GGA TAA CAC TGT C
Ony 2	GTG CAG TGT AAC ATT TGA ATC TTC TG
Ony 3'	CGT GCA TAT AGT AAA ATA ATT CTC C
Ony 5'	GCA CGA GCA AAT GTT AGC TCG C
PalHc3	CAG CTT GGT GCT TCA GCG ATT C
PalHc5	CAC ACT ATT ATG GTT CCC TAC AC
Pal 5-2	CCT CCA CTC TAC GAA GTC AC
Sc.3'intern	CCG GTA AGA ACA GCG TCC GTC AG
Sc.5'intern	CGT TTG TCC AAT GAT TTG CCA CG
Sc.intern2	ACA GCC ACG GTT AAA GTA AGG C
Sc.intern3	GTG GGT GTC TCA CAG GTC TTT C
Sc1	GAG GAT CTG TTC TTG TAC GCC CTG TC
Sc2	GCA CAC AGA CCC GAC TGC CAG GGA G
Sc3'	CTG ACG GAC GCT GTT CTT ACC
ScHc2intern	CGA ACG CGG TCA CCC ATA CAT ATT G
ScPCR 1	GAG AGG GCG TAC AAG AAC AGA TCC TC
ScPCR 2	TCC CTG GCA GTC GGG TCT GTG TGC
Spi 1	TAG ATG TGG TCA ACA GGC ATG G
Spi 10	AAT ATC TTG TGT CCA GAT GGA TGG
Spi 11	CAG TAG AAT AGT TCT CCA AGT TTG GA
Spi 12	TTC GAA TGT TGA TGA GGA CGT CG
Spi 13	ACC TCG TGT ACT CTA GGT ACG TG
Spi 14	GAC AAT GGC CAC GGA GAG TC
Spi 2	GGC ATG GTG ACG CTG GAT TCG
Spi 3	CGT TAT GAC CAG GTT TCA ATG TGG
Spi 4	TCT TGG CAG CCA AAT ACG AC
Spi 5	CGA GTG GCC TTT TGT CTA G

Spi 6	TCG GGC ATT GTT GTC GAT ATC
Spi 7	CAT CCA AAG AAC GGG TTA CAC
Spi 8	ACA AAA GCT CAC TGT CAA ATC TGG
Spi 9	GCA ACC ATT TGT CGG TGC ATC C

## 5. Übersicht über alle ermittelten Hämocyanin-Untereinheiten

Hämocyanin Untereinheit	cDNA bp	Protein AS	Molekülmasse kDa	IEP pH
HamHcA	1962	654	75,5	5,89
PelHc1	1971	657	75	5,21
PelHc2	1974	658	75	5,22
PelHc3	1974	658	75	5,47
SpiHc1	1908	636	73,7	6,2
ScoHc1	1908	636	74,4	5,87
ScoHc2	1944	648	74,8	6,96
OnyHc	1923	641	73,6	8,39

## 6. Multisequenz-Alignment

siehe folgende Seiten

```

*          20          *          40          *          60          *          80
PlePPO : MQVTQKLLRRDTEMADAQKQLLYLFRPYDPINAPRADGSLYAVAGA-----DTVATRIGVAPTSTVTVP : 66
PmoPPO : -----MANDQQRLLYL FELPQEDIQAPRGGGSLVFKLESD-----EAPPSVATRVGVSPSNVLPVP : 56
TmoPPO : -----MASKKNIL-LLFDRPREPVFIAGSKKAVFSVENEYLADK---YKPLGVALTNRFGEDAD--ERID : 60
BmoPP01 : -----MSDAKNNLLLFDRPSEPCFMQKGEFNNAVFEEDNYYPEK---YQRVSNATGNRFGSDAG--RMIP : 61
BmoPP02 : -----MADVFESELELLFDRPNEPLITPKGEINNSVFQLTEQFLTED---YANNGIEINNRFGDDAS--EKIP : 61
BmoPP03 : -----MSDAKNNLLLFDRPSEPCFMQKGEFKAVFDIEDNYYPEK---YQRVSNATGNRFGSDAG--RMIP : 61
MsePP01 : -----MADIFDSFELLYDRPGEPMINTKGEKXVLFELTEQFLTPE---YANNGLEINNRFGDEEVSARKII : 63
MsePP02 : -----MTDAKNNLLYFDRPNEPCFMQKGEKXVVFELPDHYYPDK---YKLSLNTLSNRFGNEAT--KRIP : 61
OnyHc  : -----MPST--SQKQEVLDFFNIPETRRVSRKQKDKPSVIFK----- : 36
EcaHcB : -----MPST-AFKQRRILPFFCFTSLST---KDKFGILVQRD----- : 33
EcaHcC : -----MPSDANEMCARLQLFEHSTLST---KAKFGLRVRD----- : 34
EcaHcA : -----M-TILHDKQVQALKEFKLSVAA-----TGEFVPADQID----- : 33
LpoHc2 : -----TLHDKQIRICHFEQLSSAT---VIGLGDKHKHS----- : 31
EcaHcD : -----MTIADHCAIRILPFFKLTSLST---PD-PLPEAERD----- : 31
EcaHcE : -----MPDKQKQLRILSFEHMTSIN---T--PLPRDQID----- : 30
EcaHcF : -----MTVQDKQCRQILPFFKLTSLST---RG-GLDRTESD----- : 31
TtrHcA : -----TIKEKQASILALFEHLSVSP---KQ-HIPEKERD----- : 30
AauHc6 : -----TVADKCARIMPLFKHLTALT---RE-KLPLDQRD----- : 30
EcaHcG : -----MASIPEKCALILPFEKLTSLT---KE-TPPRAQWD----- : 32
SpiHc  : -----MKLFILAVVLLATTAIAEKCP-KPVNVEAKQMVDTLSYINKPA---NP-VPPKPID----- : 54
ScoHc1 : -----MWSLALATLFLVLTGTVIRADQCPPVPADTKDKLEKLEIGHNRPRL---TP-ETPEPAGY----- : 56
ScoHc2 : --MDTRVLRRLTLALVALSGVLADSESCSSAIVNDYKLLCKEIQHVDVTINKPV---YP-DFKDTRGI----- : 61
HamHcA : -----TLVAAAAAWPFSFYQNDASGDSTAKRQQDVNHLDRTYDHL---HYSDLKQISETFSEADTSMYTD : 64
PinHcB : -----DALGTGNNAKQDQDINHLLDKTYEPT---KYPDLKDAEENFNPLGDTSIYND : 48
PinHcA : -----DALGTGNNAKQDQDINHLLDKTYEPT---KYPDLKDAEENFNPLGDTSIYND : 48
PvuHc  : -----DVHSSDNAHKCHDVNHLLDKTYEPI---KDEKLHNTAHTFNPVADTSIYGD : 48
PelHc1 : KVLVLCALVATAAAWPSFSGELTNGFQSDVHSSDNAHKQDQDINHLLDKTYEPI---KDEKLHNTAHTFNPVADTSIYGD : 76
PelHc2 : KVLVLCALVATAAAWPSFSGELTNGFQSDVHSSDNAHKQDQDINHLLDKTYEPI---KDEKLHNTAHTFNPVADTSIYGD : 76
PelHc3 : KVLVLCALVATAAAWPSFSGELTNGFQSDVHSSDNAHKQDQDINHLLDKTYEPI---KDEKLHNTAHTFNPVADTSIYGD : 76
CmaHc6 : -----TAGGAFDAKQCHDVNSALWKKVYEDI---QDPHLIQLSQNFDPDPL--SGHYDD : 46
CsaHc  : ----MKLLLLCALVAGASAWPNFGMMADSPGGASNAKCHDVNSLWKKVYEEI---RDPHLKELSCSFDPL--SGHYDD : 70
PvaHc1 : -----LLALVAAAAWPNFGFQSDAGGESDAKCHDVNHLLDKTYGNL---RYSDLKAKADSFDPAGRFGSYSD : 66
PvaHc  : -----MRVLVVLGLVAAAAFQVASADVQKQDVLVYLNKLYGDI---QDGLLATANSPDPVGNLGSYSD : 62
PinHcC : -----ADCQAGDSADKLLAKQCHDVNVLVYKLYGDI---RDDHLKELGETFNPQGDLLLLYHD : 54
SamHc  : ----MRLMWLAVLVVAVALGGAQAGIGDVPADKPFMLKQREVLRLFNKVEHEPN---RYKIQVEIGNAYEPLNS-LPRYR : 71

```

```

*          100         *          120         *          140         *          160
PlePPO : ARPDAD--RRLIGRAPSVPRGAVFSFFIRSHREARDLQVLMKTKQ--NSTDLMOAASVRRHVNENLFIYALSFITLKR : 142
PmoPPO : ERKDVT--QDILGTATSVPKGSAFSEFFIASHRKAARDLQVFFMKTS--GAEIDLMOVAARVHGKVNELTFYVAISFVILLRK : 132
TmoPPO : VKKIS---PPFGEILEL SRDENFSIFIPKRRIRAGRLIDIFLGMK--NVDDLVSVAVYARDRVNPPYLFNVALSVAILLR : 135
BmoPP01 : IRNIA---PNLDLPMELPYNEQFSLFVPKHRLKLAGRLIDIFMGMR--DVEDLQSVCSYCOLRINPYMFINVCLSVAILLR : 136
BmoPP02 : LKNLSK---LPEFKIATQLPKDAEFSIFLPAHQEMANELLGVLNVPENELQDLSTCAFARVNLNQLFNVCYSVALMHR : 139
BmoPP03 : IRNIA---PNLDLPMELPYNEQFSLFVPKHROMAGKRLIDIFMGMR--DVEDLQSVCSYCOLRINPYMFINVCLSVAILLR : 136
MsePP01 : LKNLDK---LPEFPKAKQLPNDAFSLFLPSHQEMANEVIDVLMSTVENQLQELSTCVYARINLNLPQFNVCYVAIMHR : 141
MsePP02 : IRNIT---PNLEVPMQLPYNDQFSLFVPKHRTMAAKRLIDIFMGMR--DVEDLQSVCSYCOLRINPYMFINVCLSVAILLR : 136
OnyHc  : -----PLPAGIGKLLKGNLFSFFIKRHRBESTKVIHFLLSK---DYKGFLENAASLRPVVNEILFVYCFVSVALYQS : 105
EcaHcB : -----PRLAGLGVLRGVLFSCFHEHHLKEATQLYVLIICE--SFEEFDLCHQAREYVNEGLYVAVSVAILLR : 102
EcaHcC : -----PKLAGIGLGRGKIFSCFHEHDLLEASRLAEVVLGAE--TFDEFIDLCHQCRDFVNEALFVYSLVAILLR : 103
EcaHcA : -----ERLRNITTLGPNEFSCFYPDHLQAKRVYVFCFAA--NFDDFVSLAKQARSFMNSTLFAFSAEVALLR : 102
LpoHc2 : -----DRLKNVGLQPGALFSCFHPDHLLEARHLVYVFWVWAG--DFNDFIEFAKEARTFVNEGLEFAFAEAVAILLR : 100
EcaHcD : -----PRKGVGFLPRGTLFSCFHEHHLAEATLALAVLWAK--NFDDFIALATNARAVNNEGLYVAFAMSVAILLR : 100
EcaHcE : -----ARLHHLGRLLPQGLFSCFHEHDLLEATELMLIYTAK--DFDEVINLAKQSRFTVNEGLFVYAVSVAILLR : 99
EcaHcF : -----VRDRRVGRLPRGTLFSCFHSBHLKATELYOILYKAD--SFADFIIHLAQQAQRIVNEGLFVYVSVAILLR : 100
TtrHcA : -----NRLHDVGHLSRGKLSLFRHREHLLEATHLYLILHAAK--NFDDFLLCKQARDFVNEKMEFAYAVSVAILLR : 99
AauHc6 : -----ERIKGVGTLPRGTLFSCFHAFHLAEATELVVALYGAK--DFNDFIHLCEQARQIVNEGMFVYAVSVAILLR : 99
EcaHcG : -----PRLAGVGLPRGTLFSCFHEHHLLEATKLVLYSAE--SFNDFLOLAREARVNEGLFAYAVSVAVIHR : 101
SpiHc  : -----PKKLIIGILPKDQVFSIFDEFIWDVSEVLEKRFMAAP--TFEDFIKVAETLYPHVNEDLFLFGLSVAVIHR : 124
ScoHc1 : -----DETKLGLGLPQHEIFSLFDEFIWPATKAAPFLMEAT--DFEHIQIQRADVLRRINEDMFMVALNVAVLR : 127
ScoHc2 : -----IDESKIKGLGTLPRREVFSIFDEFIWAFAAKVVEVLLLEPK--TFEFIHILADI IHRVNEDLFLYALSVAIAHR : 133
HamHcA : GGTAHHHLMEELNDRHLEQHHWFSLFNTRORKEALMLFVLMHCK--SWECFVDNAAFRRFRMNEGEFAYALYTAIVHS : 142
PinHcB : HGAAAEALMKEINDRHLEQRHWFSIFNTRORKEALMLFVAVLNCK--EWYCFRSNAAFFRRFRMNEGEFVYALYVSVIHS : 126
PinHcA : HGAAAVETLMEELNDRHLEQRHWYSIFNTRORKEALMLFVAVLNCK--EWYCFRSNAAFFRRFRMNEGEFVYALYVSVIHS : 126
PvuHc  : DGAAAKTLMQELNDRHLEQHHWFSLFNTRORKEALMLFVAVLNCK--DWNCFLNNAFFRRFRMNEGEFVYALYVSVIHS : 126
PelHc1 : VGAAAKTLMQELNDRHLEQHHWFSLFNTRORKEALMLFVAVLNCK--DWNCFLNNAFFRRFRMNEGEFVYALYVSVIHS : 154
PelHc2 : DGAAAKTLMQELNDRHLEQHHWFSLFNTRORKEALMLFVAVLNCK--NWNCFRNNAFFRRFRMNEGEFVYALYVSVIHS : 154
PelHc3 : DGAAAKTLMQELNDRHLEQHHWFSLFNTRORKEALMLFVAVLNCK--DWNCFLNNAFFRRFRMNEGEFVYALYVSVIHS : 154
CmaHc6 : DGVAAKRMLKELNDRHLEQKHWFSIFNTRORKEALMLVLEHST--DWSTFAGNAAFFRVFRMNEGEFVYALYAVIHS : 124
CsaHc  : DGVAAKRMLKELNDRHLEQKHWFSIFNTRORKEALMLVLEHST--DWSTFAGNAAFFRVFRMNEGEFVYALYAVIHS : 148
PvaHc1 : GGEAVQKLVREVKDGKLLQQRHWFSIFNTRORKEALMLFVAVLNCK--DWNCFVNNAFFRFRMNEGEFVYALYAVIHS : 144
PvaHc  : GGAAVQKLVQDLNDGKLEQKHWFSIFNTRORKEALMLFVAVLNCK--DWNCFVNNAFFRFRMNEGEFVYALYAVIHS : 140
PinHcC : NGASVNTLWADFKDGRLLQKHWFSIFNTRORKEALMMHRVLMNCK--NWHAFVSNAAFFRTNMMNEGEYLYALYVSLIHS : 132
SamHc  : NPAPVKQLVRLYRAGSLPRGAIFTLFDTHREQMILLFESLIYAN--DWETFLRTAAWARDRVNEGEQVYALCVAVLHR : 149

```



```

      *           180           *           200           *           220           *           240
PlePPO : QELRGVRLPEILEVPHKFTPMEDLTSMQVEVNRTPPTATPLVIEYGPPEFANTNQKAEHVSYSWEDDFGINSHHWHHL : 222
PmoPPO : KELRSVRLPTMVEVPSRFVQEQALSKAQLQINRMDPNQTEPVIIEHGPEFSGTHLKPEHRIYSWEDDYGINVHHWHHL : 212
TmoPPO : PDTQDVLPSFIESRFDKYVDAKFAQAREQATVVP--EGSRAPLETPKDYTASDLEEEHRLAYFREDLGINLHHWHHL : 213
BmoPPO1 : PDTKGLSIPFAEAFDPKEMDPKFRQAREVSSVVP--SGARMPVLPISNYTASDTEPEORVAYFREDIGINLHHWHHL : 214
BmoPPO2 : RDTRKVRVKNFAEVPSKFLDSQVFTQAREATAAVLPP-DVPRIPILIPROYTATDLEEEHRLAYWREDIGINLHHWHHL : 218
BmoPPO3 : SDTKGLQIPFAEAFDPKEMDPKFRKAREVTSVVP--TGARMPVLPISNYTASDAEPEORVAYFREDIGINLHHWHHL : 214
MsePPO1 : RDTGKVRVQNYAETPAKFLDSQVFTQAREAAAVLPK-TIPRTPILIPROYTATDLEEEHRLAYWREDLGINLHHWHHL : 220
MsePPO2 : PDTKGLSIPFAEAFDPKEMDSKFLRAREVSNVVI--SGSRMPVNVPIVNTANTTEPEORVAYFREDIGINLHHWHHL : 214
OnyHc  : PHTTNLAPETWQIMPYDFDQREVENQINGIESTKGAPDKQ-PIQVILEPTGNRRDPEFKLSYFEDIAINSHHWHHV : 184
EcaHcB : QDCRGVSLPEVQEVDPKFPVPELTFKAFKEVRL---HPDDE-ELIVDIEKTGNVKDPEYNLAYFREDIGVNAHHWHHL : 178
EcaHcC : PDCHGISLPEIQEIPDKFVPEITTYKAFKEATR---HADKTDDIIVDMBATGTIMDPEYNLAYFREDIGINAHHWHHV : 180
EcaHcA : EDCRGVIVPEVQEVADRETPADSLIKAFTLATTT--QPDESDEIVDKDTGNIIDPEYKLAYFREDIGVNAHHWHHV : 180
LpoHc2 : DDCKGLVPEVQEVIPDKFVPAEITNRAALKVKDVS--PEFDESPLLVVDVQDTGNIIDPEYKLAYFREDVGINAHHWHHL : 178
EcaHcD : DDCKGVVLPVPEIQEVIPDKFVPAEITNRAALKVKDVS--DPNK--DTPVPIQKGTGNIRDPPEYNVAYFREDIGINSHHWHHL : 176
EcaHcE : DDCKGIWVPAIQEIPDKFVPEITNRAVKEAAN---HPDQ--DLSVHVVEBTGNIIDPEYKLAYFREDVGINAHHWHHL : 174
EcaHcF : DDCKRGVIVPEIQEIPDKFVPAEITVQAQVADLK---RQSSDEIVLVEIQETGNIIDPEYKLAYFREDIGVNAHHWHHI : 177
TtrHcA : DDCKRGLIIPVEEVIPDKFVPEITVREAAQKEVEL---HPG---KDIVEVENTGNIIDPEYKLAYFREDLGVNAHHWHHI : 173
AauHc6 : EDCRGITVPEIQEVIPDKFVPAEITNRAKKEASN---HPDQ--SIVVEAETGNIIDPEYKLSYFREDIGINAHHWHHI : 175
EcaHcG : DDCKGVTLPEIQEVIPDKFVPEITNRAKKEAKN---DPNS--DILVVDVQETGNIIDPEYKLAYFREDIGVNAHHWHHV : 176
SpiHc  : PDANGVHVPEVHEVDPKFLINDVLINIRKQIIGK--HKN---PVVKDTHYHNDPEFRVVDYFTEDLGMNSHHWHHV : 199
ScoHc1 : KDTREGVQVRIHKIVPKFLKQDILVEVREKVNHG--EEK---PVVDATLHQNQIDPNYRLSYFLEDIGMNSHHWHHV : 202
ScoHc2 : PDCQGVQVPEVLDIVPKFLRKEVTHKIKEVSNEGAYLDKV--PVIDATVSDNHLDPNQLLYFTEDLGMNSHHWHHV : 211
HamHcA : ELGCGIVLPELYEITPHMFTNSEITHKAYTAKMTQT-----PGRFEMKFTGTTKKNKEORVAYFCEDIGINIHHVWWM : 215
PinHcB : KLGDCIVLPELYEITPHMFTNSEITDKAYSAKMTQK-----PQTFNVSEITGTTKKNREORVAYFCEDIGMNIHHVWWM : 199
PinHcA : KLGDCIVLPELYEITPHMFTNSEITDKAYSAKMTQK-----EGTFNVSEITGTTKKNREORVAYFCEDIGMNIHHVWWM : 199
PvuHc  : KLGDCIVLPELYEITPHMFTNSEITDKAYSAKMTHK-----EGTFNMSFTGTTKKNREORVAYFCODIGMNIHHVWWM : 199
PelHc1 : KLGDCIVLPELYEITPHMFTNSEITDKAYSAKMTHK-----EGTFNMSFTGTTKKNKEORVAYFCEDIGMNIHHVWWM : 227
PelHc2 : KLGDCIVLPELYEITPHMFTNSEITDKAYSAKMTHK-----GNTFFDMSFTGTTKKNREORVAYFCEDIGMNIHHVWWM : 227
PelHc3 : KLGDCIVLPELYEITPHMFTNSEITDKAYSAKMTHK-----EGTFNMSFTGTTKKNKEORVAYFCEDIGMNIHHVWWM : 227
CmaHc6 : ELTQHVVLPPELYEITPHLFTNSEITQEAAYKAKMTQT-----AAKTESHFTGSKSNPEORVAYFCEDIGMNIHHVWHL : 197
CsaHc  : PLTEHVVLPELYEITPHLFTNSEITQAAAYKAKMTQT-----ASKIKSHFTGSKSNPEORVAYFCEDIGMNIHHVWHL : 221
PvaHc1 : PLTEHVVLPELYEITPHLFTNSEITESAAYRAKQTK-----PCKFESSFTGTTKKNPEORVAYFCEDIGMNIHHVWWM : 217
PvaHc2 : SLAEQVVLPELYEITPHLFTNSEITESAAYRAKQTK-----PCKFKSSFTGTTKKNPEORVAYFCEDIGINIHHVWWM : 213
PinHcC : GLGDCVLPPELYEITPHMFTNSEITHEAAYKAKMTNT-----PSKFESEHTGSKKNPEORVAYFCEDVGMNSHHVWWM : 205
SamHc  : EDTRCVVLPPEPYEITPHLFTNSEITHEAAYKAKMRQE-----PAVVHMNFTGTTIRNPEORVAYLCEDLGMNSHHVWWM : 222

```

```

      *           260           *           280           *           300           *           320
PlePPO : VYPIEM-----NVNRDRKGELFFYYMHQQVVARVDYERLSVNLNRVLEKLEWRVPTEDGYFSKLTNNSCRPQWGTQDNTF : 297
PmoPPO : IYPPAM-----CFDRDRKGELFFYYMHQQVVARVDYERLCLGLPQVEKLDNRVPTEDGYFKMVTLSISCRWGSQRDNTL : 287
TmoPPO : VYPTAARE--VVAKNRRGELFFYYMHQQVVARVDYERLQNKIKRATRFNFKQATQEAAYFEKLDLSVASRSWPARVGNQR : 291
BmoPPO1 : VYPTDAADRA-IVNKNRRGELFFYYMHQQVVARVYVERMOMNLSVRRYNNFRAATIEGYFEKLDLSVASRAWPPRFAGTT : 293
BmoPPO2 : VYPTANDLS-IVAKNRRGELFFYYMHQQVVARVFCERLQNSLKRVKKFSNWRPTEEAAYFEKLDLSLTSSRCWPPRQSGMQ : 297
BmoPPO3 : VYPTDAADRA-IVNKNRRGELFFYYMHQQVVARVNIERFQNDLRVETYSDFRGPKEGYFEKLDLSQVASRAWPPRFAGSF : 293
MsePPO1 : VYPTASADEK-IVAKNRRGELFFYYMHQQVVARVFCERLQNSLKRVKKFSNWRPTEEAAYFEKLDLSLTSSRCWPPRQAGMR : 299
MsePPO2 : VYPTSDADRS-IVNKNRRGELFFYYMHQQVVARVYVERMONGLPQVKPESDFSAPIEGGYFEKLDLSQVASRTWPPRFAGSV : 293
OnyHc  : IYPVGS-NPS-DKKLNRRGELFFYYMHQQVVARVDAERLQNGVRVYKSLHGYDEITIEGGYERLHLSKISGTIYASRQANTR : 262
EcaHcB : VYPTATWRPEVVHRIKDRKGELFFYYMHQQVCARYDSERLSNGIARMPVPHNFPEPM-EGYS-SHLSSGINGMPYAFRPHGRI : 257
EcaHcC : VYPSAWDSVMMHMRKDRKGELFFYYMHQQVCARYDCERLSNGIARMIIPPHNFHEPL-EGYNPHLSSQNGLEPYAFRPHPMT : 259
EcaHcA : VYPTSTWNPKYFCKKDRKGELFFYYMHQQVCARYDCERLSNGIARMIIPPHNFHEPL-EGYAPHLTHVASCRFYAQRPDGLA : 259
LpoHc2 : VYPTSTWNPKYFCKKDRKGELFFYYMHQQVCARYDCERLSNGIARMIIPPHNFHEPL-AGYAPHLTHVASGKYYSRPLGLK : 257
EcaHcD : VYPTAFYDADIFCKIKDRKGELFFYYMHQQVCARYDCERLSVGLQRMIPPHNFDEPL-EGYS-PHLRSLVLSGLSYGSRFAGMH : 255
EcaHcE : VYPTATWDPAFMCRMKDRKGELFFYYMHQQVCARYDCERLSNGIARMIIPPHNFHEPL-EGYAPHLTHVASGKYYSRPLGLC : 253
EcaHcF : VYPTWSDASVMSKVKDRKGELFFYYMHQQVCARYDCERLSVGLQRMIPPHNFDEPL-EGYS-PHLRSLVLSGLSYASRFAGLH : 256
TtrHcA : VYPTATWRSEVMCKTKNRRGELFFYYMHQQVCARYDCERLSNGIARMIIPPHNFHEPL-EGYAPHLTSMISGLYGVRFSGMK : 252
AauHc6 : VYPTATWNPVTMGKEKDRKGELFFYYMHQQVCARYDSERLSNGIARMIIPPHNFHEPL-EGYAPHLTSMISGLYASRFAGYS : 254
EcaHcG : VYPTANWDAVFTCKTKDRKGELFFYYMHQQVCARYDCERLSNGIARMIIPPHNFHEPL-EGYAPHLTSMISGLYASRFAGL : 255
SpiHc  : LHPSTWTDI-G-EKSKLGEFFYYMHQQVVARVFBSELLSVHLPRISSLDWNKKVKIGYAPHLTIQRTICYIMNRPENLE : 277
ScoHc1 : VHPAVWLPHK-CPRKDRKGELFFYYMHQQVVARVYDSERLSNGLPTEPFENWDDPEEGYAPHLTIHKTCYIMYFRPEGLI : 281
ScoHc2 : LHPATWLPHK-GGVRDRKGELFFYYMHQQVVARVYDTERLSNDLPRVRFENWDDPEEGYS-PHLIIDKTCYIMAYRPGCVI : 290
HamHcA : DFPFWWQDSY-CYHLDRKGELFFVWHHQLTARFDFERLSNWLDVDELH-WDRIRREGFAPL-TSYKYCGFFPVRPDNIH : 292
PinHcB : DFPFWWQDSY-CYHLDRKGELFFVWHHQLTARFDFERLSNWLDVDELH-WDRIRREGFAPL-TSYKYCGFFPVRPDNIH : 276
PinHcA : DFPFWWQDSY-CYHLDRKGELFFVWHHQLTARFDFERLSNWLDVDELH-WDRIRREGFAPL-TSYKYCGFFPVRPDNIH : 276

```

PvuHc : DFPFWDDSY-GYHLDRKGELFFVWHQHTARFDAERFNSWMDPVDELH-WDDIIEGFAFH-ASYKYCGFFPTRPDNTH : 276  
 PelHc1 : DFPFWDDSY-GYHLDRKGELFFVWHQHTARFDAERLSNWMDPVDELH-WDDIIEGFAFH-TSYKYCGFFPVRPDNTR : 304  
 PelHc2 : DFPFWDDSY-GYHLDRKGELFFVWHQHTARFDAERLSNWMDPVDELH-WEEVIEGFAFH-ASYKYCGFFPTRPDNTQ : 304  
 PelHc3 : DFPFWDDSY-GYHLDRKGELFFVWHQHTARFDAERLSNWMDPVDELH-WDDVIEGFAFH-ASYKHCFFPTRPDNTR : 304  
 CmaHc6 : EFPFWDDAHENHILERKGSFFVWHQHTVRFDAERLSNYLDPVDELH-WDDVIEGFAFH-AVYKYCGFFPSRPDNTH : 275  
 CsaHc : EFPFWDDSHENHILNRKGSFFVWHQHTVRFDAERLSNYLDPVDELH-WDDMIEGFAFH-TMYKYCGFFPSRPDNVN : 299  
 PvaHc1 : EFPFWDDKY-SHFLDRKGNFFVWHQHTVRFDAERLSNYLDPVEELS-WDKPIVQGFAPH-ITTYKYCGFFPSRPDNDV : 294  
 PvaHc : EFPFWDDAY-GHFLDRKGNFFVWHQHTVRFDAERLSNYLDPVDELH-WNKPIVQGFAPH-ITTYKYCGFFPARPDNVK : 290  
 PinHcC : EFPFWDDSS-CRFLDRKGSFFVWHQHTVRFYDAERLSNYLDPVEELS-WNKALDEGFAFH-ITTYKYCGFFPSRPDNVH : 282  
 SamHc : DFPFWKDEYCIERERKGEFLFYMHQHTARFDEERLSNDLPFVEPLY-WTERIKDGFYFH-ITTYRVCFFPARPDNFA : 300

\*                    340                    \*                    360                    \*                    380                    \*                    400

PlePPO : IKDFRRNDAGLDFIDISDMHWRSRIMDAIHQGMVLRNNGRVRPLSDNVTGKRGIDILGFAFEADAQLSPNYLFGDHLH : 377  
 PmoPPO : PKDTRRRELG-EFVDITDMHWRSRILDAIHQGMIDRNGDKVPLRDDVTSQKRGIDILSFALEADAELSNVFPYGDHLH : 366  
 TmoPPO : LKDLNREVQD-IKQVDDIKRWSRIIYAIHQGSATDERGRKIDETEN-----EGIDILGNMIES-SILSNRRTFYGDMH : 364  
 BmoPPO1 : LRDLRDPVDQ-IRSDVSELTWRFRFLQATENMSVMLPNGRQLPLDEE-----TGIDVLGNLMES-SIISNRNPYGDHLH : 366  
 BmoPPO2 : WQDLNRAAEG-LFVTIDEWRWRRNVEEATATGIVRLPNCQTRPLD-----IDTLGNLMES-SALSINRELKYSIH : 366  
 BmoPPO3 : LRDLRDPIDQ-IRLIDISELHWRFRFLKALIDMAVILPNGRQMPLEDEE-----TGIDVLGNLMES-STISVNRPYGDHLH : 366  
 MsePPO1 : WQDLKRPVDG-LNVTIDDWRWRRNVEEATATGNVILPKSTKPLD-----IDMLGNMMEA-SVLSINRDLKYSIH : 368  
 MsePPO2 : FRNLRRTVDQ-VKILVRKLFWRFRFLQATENKMAIKMPNGRELPLDEV-----TGIDMLGNLMES-SIISNRPYGDHLH : 366  
 OnyHc : MMDTLD-----NIVIEERFRFRRIEHAISVGVIELPNTKTPENNE-----CGIDILADLIEA-SNYSINLAYGDLH : 329  
 EcaHcB : LKDMRE-----VSVQDLFRSRIRLLDAIHLGIVWDPNGLLETPLDEL-----EGIDILGALIES-SNDSNPKLYGSLH : 324  
 EcaHcC : LCOMHD-----VSVQDLFRWRIRILDALNLSVETDPCNGEYALDET-----FGIDVLGALIES-SRDSKRNRESYGS LH : 326  
 EcaHcA : MHDVRE-----VLDQDMRRTIRIMEADLRRVISPTEHYIPLDEE-----FGADILGALIES-SYESKNRKYGSLH : 326  
 LpoHc2 : LRDLGD-----LHISEVWRMRIRILDSTHGLVISEDGSHTKIDDEL-----FGIDILGALVES-SYESVNHYYGNLH : 324  
 EcaHcD : LRDLND-----CSVQDMRWRIRILDALHTGLVITDSHGKIKLITE-----GINILGALIES-SHDSVNMKPFYGTLLH : 322  
 EcaHcE : LHDLDK-----LILKEMFRWRIRILDALDSGYVIDNEGHQVKLDIV-----DGINVLGALIES-SFETRNKLYGSLH : 320  
 EcaHcF : LRDLVDF-----VLDQDMARWRIRLLYSIDIGHVIDHEGOEIPDAE-----FGIDVLGALLES-SHDSINDDYGNLH : 324  
 TtrHcA : LHDLVV-----VLIQDMERWRIRIMEADLHLVNDTNGN--KLEDET-----TGIDVLGALVEA-SHDSINPEYGS LH : 317  
 AauHc6 : IHDLSV-----VLDQDMRWRIRILDALNMHYIVDKDNKIPLDIE-----FGIDILGALIES-SDESKNVYGS LH : 321  
 EcaHcG : LRDLSE-----VLDQDMRWRIRILDALYHLNVHDRBNNDVLDLDAE-----FGADILGALIES-SSDSNRRFYGS LH : 322  
 SpiHc : LEDLPE-----LTKGELMQKWRIRIMEAIDARHNTLTKGCPGKKRRTTPE---NGIDIFGHLIAA-TKNSINRRYGNLH : 346  
 ScoHc1 : VRDLPE-----LNNKMRQWKRIRILDHGLHLNVYAENGTKISLDNE-----FGIDLLGALIES-SLLSNRAFYGNH : 348  
 ScoHc2 : VHDLPN-----LPKTKMFEKWRIRIMVCGIKSLSISANKTOVPLNND-----FGIDLLGDVVES-SLLSNRFYGNLH : 357  
 HamHcA : FEDVGV-----ARVRDMIIIESRIRDAIAHGVTATDGHITIDIRQP----KGIELLGDIIIES-SVYSINAOYGSALH : 360  
 PinHcB : FEDVGV-----ARVHDLIIITESRIRDAIDHGYITATDGHITIDIRQP----KGIELLGDIIIES-SMYSINVOYGS LH : 344  
 PinHcA : FEDVGV-----ARVHDLIIITESRIRDAIAHGVTATDGHITIDIRQP----KGIELLGDIIIES-SKYSINVOYGS LH : 344  
 PvuHc : FKNVGV-----ARVRDMIIITESRIRDAIAHGVTATDGHITIDIRQP----NGIELLGDIIIES-SMYSINPHYGS LH : 344  
 PelHc1 : FEDVGV-----ARVHDMIIITESRIRDAIAHGVTATDGHITIDIRQP----NGIELLGDIIIES-SMYSINPHYGS LH : 372  
 PelHc2 : FKNVGV-----ARVRDMIIITESRIRDAIAHGVTATDGHITIDIRQP----NGIELLGDIIIES-SMYSINPOYGS LH : 372  
 PelHc3 : FKNVGV-----ARVHDMIIITESRIRDAIAHGVTATDGHITIDIRQP----NGIELLGDIIIES-SMYSINPHYGS LH : 372  
 CmaHc6 : FEDVGV-----ARVRDLLIEERILDALAHGW-RINGQIVDLRNN-----DGIDLLGDVIES-SLSPNPOYGSALH : 342  
 CsaHc : FEDVGV-----ARVRDLIIIESRIRDAIAHGVTATDGHITIDIRQP----NGIELLGDVIES-STYSINPVYGS LH : 367  
 PvaHc1 : FDDMGV-----ARIRDLLIIIESRIRDAIAHGVTVDKVCNHIDIMNE----RGIDVLGDVIES-SLSPNVOYGSALH : 362  
 PvaHc : FEDVDV-----ARIRDVIVIESRIRDAIAHGVTVDSEKHIIDLSNE----KGIDILGDIIIES-SLSPNVOYGSALH : 358  
 PinHcC : FSDVGV-----ARVRDMIIITESRIRDAIAHGVTDALDGHISIDIMNS----KGIEFLGDIIIES-SGYSANPGYGS LH : 350  
 SamHc : FHDLCNI-----KVQQNIDYTRVRVRECISSQAVITETGSLYNISSP-----EGINVLGELIEP-STGSRHREYGSALH : 367

\*                    420                    \*                    440                    \*                    460                    \*                    480

PlePPO : NTEHVLLAFCHDNDNSHREICVMGDSATARDPFFYRWHKVFDDIFQEVKLTQF---PYTMEDLSLPGVLDKVGWR-- : 453  
 PmoPPO : NREHDILAFSHDPDIAHKEEMGVVGLLGTSTRDPFFRILHKLVDLDFQEVKVTQF---PYTEEELFLPGVRIERAGVVR- : 442  
 TmoPPO : NMCHVFISYVHDPDRHRLSFGVMGDSATARDPFFYRWHYSYIDDFQEVKATLP---RYTENQLAFPGVIVSKVEVQVQ : 441  
 BmoPPO1 : NMCHVFISYHDPDRHRLSFGVMGDSATARDPFFYRWHAYIDDIFHILKYKLT---PYGNDRLEFPNIRVSSVIEG- : 442  
 BmoPPO2 : NMCHSFTAYMHDPDRHRLSFGVJADEATTMRDPEFFYRWHAYIDDVFOKHKSAY-VRPPTIRSELNPGVQVRSVSETP : 445  
 BmoPPO3 : NMCHVFISYCHDPDRHRLSFGVMGDLATMRDPEFFRWHGYIDSVFHLKYKLT---PYSDDLRLIFPDIRVRSITLDGK : 443  
 MsePPO1 : NMCHSFSAYMHDPDRHRLSFGVJADEATTMRDPEFFYRWHAVDDIFQSPKAPHNVRPYSRSQLNPGVQVTSVAVESA : 448  
 MsePPO2 : NMCHVFISYHDPDRHRLSFGVMGDSATARDPFFYRWHAYIDDIFHILKYKLT---PYTNERLEFPNIRVSSVIEG- : 442  
 OnyHc : NTEHVMLATAHDPDKRFNSSDGVVGFVQVATARDPFFYRWHKIIDNLLQNHKRTLQ---PYTDKELIADKLETKEAITSS : 406  
 EcaHcB : NWCHVIMS AVDDPDRYQLNPGVMSDTATSTRDPFFYRWHRFIDDMFOEKKSLT---PYS-SQLQFKGVIVKSVQVRAK : 400  
 EcaHcC : NWCHVLMANIVDPCKYQINPGVMDTATSTRDPFFYRWHRFIDDMFOEKRKLK---PYTKDQLSFTGVEIKNVKVAH : 403  
 EcaHcA : NWCHVMAAYIHDPDRFRTEFGVMDTATSTRDPFFYRWHRFIDNIFHEKNTLK---PYDHDVLAFPDIOQVDTLHAR : 403  
 LpoHc2 : NWCHVIMARLHDPDRFRTEFGVMSDTSSTRDPFFYRWHRFIDNIFHEKNTLK---PYDHDVLAFPDIOQVDTLHAR : 401  
 EcaHcD : NWCHVIMARLHDPDRFRYRTNPGVMDTSTSTRDPFFYRWHRWMDNIFQEKHRL---SVTHQQLDFEGVRIISRVVRSK : 399

EcaHcE : NWGHVMMARLQDPDRFRFENFGVMSDTSTSIRDPFYRHRFIDNIFQKVIATLP---HYTPEDLTCGVEVVNVVNAK : 397  
EcaHcF : NSGHVMMARIHDPDRFRFENFGVMSDTSTSIRDPFYRHRFIDNIFQEVKATLP---CYEKKDLTFSGVEIVNCAVNAK : 401  
TtrHcA : NWGHVITARAHDPDRKFFHFNFGVMSDTSTSIRDPFYRHRFIDNVFQDKESLH---PYTKHELSTGIRKVVNVVNAK : 394  
AauHc6 : NWGHVMMANITDPDRFRFENFGVMSDTSTSIRDPFYRHRFIDNIFQEHKKSFH---PYTKHEELSFGVEVVGVSINSK : 398  
EcaHcG : NWGHVMMARMTDPDRSFEFENFGVMSDTSTSIRDPFYRHRFVDNIFQEVKATLP---SVTADDLNFEGLRIVSVQVNAK : 399  
SpiHc : SYAHVIAARLADSDGHEMEDNGAMYDVA TSARDPFYSVHKFIDNLFLETKOMTLT---PYTPYQLTWDPVVDGIEHTENL : 423  
ScoHc1 : CYAHVMAARIADDPDRYGEDNGVMHDVATSARDPFYSVHKFIDNLFLETKONLD---PYTQYELTWEDVVLNDVIVKPH : 425  
ScoHc2 : CYAHVIAAGVITDPDSTYGEKNGAMYDVA TSARDPFYSVHKFIDNIFQEHKKTLO---PYNKDELAFPDVQVDSLRINVA : 434  
HamHcA : NTAHIMLGRQGDPHCKFNMPFGVVBHFE TATRDESFRRLEHKYMDNIFKKEHKOSLP---PYTKADLFTGVAVEEVEIVGQ : 437  
PinHcB : NTAHIMLGRQGDPHCKFNMPFGVVBHFE TATRDESFRRLEHKYMDNIFKKEHKOSLP---PYTHDDLFFAGMVVDGATDGE : 421  
PinHcA : NTAHVMIGRQGDPHCKFNLPFGVVBHFE TATRDESFRRLEHKYMDNIFKKEHKOSLP---PYTHDNLFFSGMVVNGVADGE : 421  
PvuHc : NTAHIMLGRQGDPHCKFNMPFGVVBHFE TATRDESFRRLEHKYMDNIFKKEHKOSLP---PYTHEDLFFPGVSVDNIADEGH : 421  
PelHc1 : NTAHMMI GRQGDPHCKFDMPFGVVBHFE TATRDESFRRLEHKYMDNIFKKEHKOSLP---PYTHEDLFFPGVSVDNIAIDGH : 449  
PelHc2 : NTAHMMI GRQGDPHCKFDMPFGVVBHFE TATRDESFRRLEHKYMDNIFKKEHKOSLP---PYTHEDLFFPGVSVDNIAIDGH : 449  
PelHc3 : NTAHMMI GRQGDPHCKFNMPFGVVBHFE TATRDESFRRLEHKYMDNIFKKEHKOSLP---PYTHEDLFFAGVSVDNIAIDGH : 449  
CmaHc6 : NTAHMMI GRQGDPHCKFDLPFGVLEBHFETATRDEAFFRLEHKYMDNIFRKHKOSLP---PYTKHEELFEGVINDNFYIKGN : 419  
CsaHc : NTAHVMI GRQGDPHCKFALPFGVLEBHFETATRDEAFFRLEHKYMDNIFRKHKOSLP---PYTKDDLFFSGIVSDSLDISNR : 444  
PvaHc1 : NTAHIVLGRQSDPHCKYALPFGVLEBHFETATRDESFRRLEHKYMDNIFKKEHKOSLP---PYTVEELTFAGVSVDSVAIDEGE : 439  
PvaHc : NTAHIVLGRQSDPHCKFDLPFGVLEBHFETATRDESFRRLEHKYMDNIFKKEHKONLP---PYTKADLFFAGVSVDELAVGGE : 435  
PinHcC : NTAHIMLGRQGDPHCKFDLPFGVLEBHFETATRDESFRRLEHKYMDNIFRKHKOSLP---PYTRDELFFNGVSDISVAIDEGT : 427  
SamHc : NYGHIMIGQITDPRKRKNMPPFGVVBHFE TATRDEAFFRLEHKYIDNLFYEHKOLLE---RVTSEELFLEGTSTEEVQIDP- : 443

\* 500 \* 520 \* 540 \* 560  
PlePPO : --NDQLNITITGWSVREFASRGLDENSP---NPVILRLTFLDHPAFFTYHLOITNSHRKPSVTVRIYMAFKHNERGLEV : 528  
PmoPPO : --GNEADVLTGWTREFASRGLDFSG---KPVILRLTFLDNKPFDDYHICINLDLREPKEVTVRIYLAEPKFGDREKEM : 516  
TmoPPO : --GGSANTENTFWQSDVPMRGMDFQPR---GSVFRVFTLQHQEFYNYVLEVNTGGSSVMGMFRIFIAFTVDESGKPF : 517  
BmoPPO1 : --GGTPNTEITLWQSTVLLGRGMDFTPR---GVILARFTHLQHDFFQYVLEVNTGGSSVMGMFRIFIAFTVDESGKPF : 517  
BmoPPO2 : --GGQPNTEITFWMLSDVLSRGLDFSDN---GPVYARFTHLNRYRFSYRINVNNT-GSSRRTVTRIFITPKFDERNVPW : 519  
BmoPPO3 : --GAPNNTENTFWQSTVLLARGLDFSPR---GVILARFTHLQHDFFYSYVLEVNTGSRSSVMGMFRIFIAFTLDENKRP : 517  
MsePPO1 : --GGQNVNTEITFWQSDVLSKGLDFSDR---GPVYARFTHLNHRFRYVLIKANT-ASARRTVTRIFIAFKTDEINLPW : 522  
MsePPO2 : --ARPNTERTLWQSTVLLGRGLDFTPR---GVILARFTHLQHDFFQYVLEVNTTGGCLMGTVRIYMAFKVDDNQPVM : 516  
OnyHc : QTKDKPKNKLYTFFTKQLNLTKGLDFGNLE--QSLVLTFLQHQEFFTYNFKVNNITGKDFTGTFRIYMAFKNDLDDIPM : 484  
EcaHcB : ----TADVVTTFANALLLISHAFNFGRT---GPVKVRYNEFLTHEFTYKIVVDNAGTKTKATVRIYMAFKHNDLQNEF : 473  
EcaHcC : ----EENVHTTFVEDLLEISNAENFGRT---GAVKVRVYQLDHDFFYVYDDEVNHSARLRHGTCRIYMAFKVHDELQNL : 476  
EcaHcA : ----IPNVHTTFIDEDELISHCLEHFAKP---GVILARFTHLQHDFFSFSYIISAQNNSNADKQATVRIYMAFKVHDELQNDI : 476  
LpoHc2 : ----VDNVVHTFMREQELFLKHGINPGNA---REIKARYFLDHDFFSFAVNVQNSASDRHATVRIYMAFKYDELCNEI : 474  
EcaHcD : ----VPNLHTTYSKDSLLLSHCINLK----GHQVQYFLDHDFFYNVEYEVNDRGTGEARETCVRIYMAFKYDELCNRL : 470  
EcaHcE : ----VPNVHTFMKEAELFLSYGIDFGSD---HVKVLYRFLDHDFFTYNLSVQNSSSGGAQVDMRIYMAFKYDELCNRL : 470  
EcaHcF : ----APNVHTTYMKESTLMSHCHSEK----GAVKVKYQFLDHDFFTYNLSVENITGDVHKATVRIYMAFKYDELCNRL : 472  
TtrHcA : -VITARNVHTFIKKNLELTHGIDFGTT---NSVKVKYQFLDHDFFSFTQITVDNNTSGAKKDATVRIYMAFKILDELQNL : 470  
AauHc6 : ----TANVHTTLIKESLLLSHCINFGTD---QSVKVKYHFLDHDFFTYNIVVDNNSGAEKHSTVRIYMAFKYDELLNKL : 471  
EcaHcG : ----SQNRVHTFLKQEEVLSHCINFGTE---HVKVHYNFLDHDFFSFTYINVDNNSGAVHATVRIYMAFKCDELQNL : 472  
SpiHc : K-THEENMHTTYTSSSTLRSKGFDTYTKD---SEAKVIHTDHDFFVYVIDIDNARVREKATVRIYMAFKYDERGHPL : 499  
ScoHc1 : K-GDYDDEVHTYWDVNYLCKGFDYTRK---TATVKVRFLOHQEFFYHYEIDIDNAGKAKAVFRIYMAFKYNEKGELEF : 501  
ScoHc2 : N-GTYENIVRTYWNLSLFLKAKCFHTTE---GSVLVKVFLNHEFTFYNLEVNTNALEEKHGVRIYMAFKVINDERGHYP : 510  
HamHcA : ----LITFFDEFFYSILNAVDSENIEDVDINARVHRLNHEFTYKITMSNNDGGERLATVRIYMAFKPIEDNNGITL : 493  
PinHcB : ----LITFFDEFFYSILNAVDSENIEDVDINARVHRLNHEFTYKITMSNNDGGERLATVRIYMAFKPIEDNNGITL : 493  
PinHcA : ----LITFFDEFFYSILNAVDSENIEDVDINARVHRLNHEFTYKITMSNNDGGERLATVRIYMAFKPIEDNNGITL : 493  
PvuHc : ----LITFFDEFFYSILNAVDSENIEDVDINARVHRLNHEFTYKITMSNNDGGERLATVRIYMAFKPIEDNNGITL : 493  
PelHc1 : ----LITFFDEFFYSILNAVDSENIEDVDINARVHRLNHEFTYKITMSNNDGGERLATVRIYMAFKPIEDNNGITL : 520  
PelHc2 : ----LITFFDEFFYSILNAVDSENIEDVDINARVHRLNHEFTYKITMSNNDGGERLATVRIYMAFKPIEDNNGITL : 520  
PelHc3 : ----LITFFDEFFYSILNAVDSENIEDVDINARVHRLNHEFTYKITMSNNDGGERLATVRIYMAFKPIEDNNGITL : 521  
CmaHc6 : ----LETTFDEFFYSILNAVDSDTEVDVDDVIFTYISRLNHEFFSFGVDVINDLHDVVLATVRIYMAFKHEDNNGVAF : 491  
CsaHc : ----LETTFDEFFYSILNAVDSDTEVDVDDVIFTYISRLNHEFFSFGVDVINDLHDVVLATVRIYMAFKHEDNNGVAF : 491  
PvaHc1 : ----LETTFDEFFYSILNAVDSDTEVDVDDVIFTYISRLNHEFFSFGVDVINDLHDVVLATVRIYMAFKHEDNNGVAF : 516  
PvaHc : ----LETTFDEFFYSILNAVDSDTEVDVDDVIFTYISRLNHEFFSFGVDVINDLHDVVLATVRIYMAFKHEDNNGVAF : 510  
PvaHc : ----LETTFDEFFYSILNAVDSDTEVDVDDVIFTYISRLNHEFFSFGVDVINDLHDVVLATVRIYMAFKHEDNNGVAF : 506  
PinHcC : ----LETTFDEFFYSILNAVDSDTEVDVDDVIFTYISRLNHEFFSFGVDVINDLHDVVLATVRIYMAFKHEDNNGVAF : 499  
SamHc : ----LETTFDEFFYSILNAVDSDTEELPDVSIHARVRLNHEFFSFGVSRVNS--EAEFFVTVRVFLGKDYDFCQEL : 513

\* 580 \* 600 \* 620 \* 640  
PlePPO : GFMEORLWAEEMDKFTQDLKFCQNQ--IVRASNLSSITNLSGYTFRSLEAVNPANPGPP--ANAETNFCGCGWPEMLLLP : 604  
PmoPPO : DFMEORLWAEEMDKFTVLLKFKKQEHVTRSSKESSITNLELTFKOLENSGPGNTS---EQDAFNFCGCGWPEMLLLP : 592  
TmoPPO : LYRDKKNVFLDKFTVNLKQCCQNN--ITRASSQSSVTITFERTFRNLDLNRP CGGE---ELAQFNFCGCGWPEMLLLP : 590

BmoPP01 : SFDECRKLMIEIDKFSQGVKFCGNT--IRKKSIDSSVTITFERTFRNQADRPADPGT---AGAAEFDFCGCGWPHMLLVP : 592  
 BmoPP02 : IFSDECRKLMIEIDKRFVTVENAGENN--IVRQSTESSITIFFEQTFRDLSAQGNDRPR---DELATFNKYCGCGWQMLLVP : 594  
 BmoPP03 : NFDECRKLMIEIDKFSQGVKFCGNT--VRRRSVDSSVTIFERTFRNQADRPGNPGS---PESAEFDKFCGCGWQMLLIP : 592  
 MsePP01 : ALSDECRKLMIEIDKRFVVPISAGENT--ITRQSTESSLITIFFEQTFRDLSIQGSDPRR---SELAAFNYCGCGWQMLLVP : 597  
 MsePP02 : SFNDECRRLMIEIDKFSQAIFREGTNT--IRRRSVSDSSVTITFERTFRNQSRPGLDPT---AGAAEFDFCGCGWPHMLLIP : 591  
 OnyHc : EINECRILMIEIDKFKQLKLSFGENN--ITRKESDSNVTIHKEMTWEMIQ-----PDT-SGPSSQHYCA CGWPHMLLIP : 556  
 EcaHcB : DIGRLRRLMIEIDKFKTTVIEFGENV--IFRDSIDSSVTIFRQYTYFRLOD-----GRS--NREQTEYCS CGWPNLLLVP : 543  
 EcaHcC : TPEEIRRLMIEIDKFRVLEKPGVNH--NHRHSRDSSVTISKQPKFDELK-----GKG--TNNANEYCS CGWPDMLLVP : 546  
 EcaHcA : SLDECRRLMIEIDKRYHTIREGKNT--IVRSSTDSSVTISSVHTFKELLR-----GEDL-VEGQTEFCS CGWQMLLVP : 547  
 LpoHc2 : KADEFRRATEIDKFKTDLHPGKNT--VVRHSLDSSVTLSQPTFEDLLH-----GVGL-NEHKSEYCS CGWPSMLLVP : 545  
 EcaHcD : ILEFCRRMIEIDKFKHRRIEFGKIV--LVRASGDSSVTISKVPTFEELES-----GNA-NVNPNEY--CS CGWPEMLLVP : 540  
 EcaHcE : QPEQRTNIEIDKFKATLDFGKIV--VTRDHRNSTVTVEGSPVVKLLRE-----EGGV---AGEY--CS CGWPEMLLIP : 538  
 EcaHcF : RLNECRRFYIEIDKFKHAELAACKNT--ITRKSSSSSVTVSHTPTFEELQR-----GEGVDENTTEF--CS CGWPEMLLVP : 543  
 TtrHcA : PANICR--LEIDKFKHKEIISQNT--ITHNADSSVTVSTLRTFEDLKA-----GKGVSEDATEY--CS CGWQMLLIP : 540  
 AauHc6 : EPDECRRLMIEIDKFKFYTLTFGKNT--IVRNHQDSSVTISKVRFEDLGA-----EGVSESDSTEY--CS CGWPEMLLIP : 542  
 EcaHcG : EPNECRRLMIEIDKFKHKEIGPGLNT--INRNSVESNVTVAHTYTFDELRE-----GKLAPEDATEY--CN CGWPRMLLIP : 543  
 SpiHc : TLKEGRVMIEIDKFKATLDFGKIV--VRRCSNESSVTMVDHIYGDITR-----TVDEDH---CHCGWPEMLLVP : 565  
 ScoHc1 : PVNECRQLLIEIDKFKVATLDFGKIV--IBRQSKESSVTMSKDHVFEIRN-----LADHDQ---CS CGWPDYLLLP : 567  
 ScoHc2 : ILNDRHLLMIEIDKFKTVNLEKCKNS--IVRQPCYNSAVTAKYDYVGDVES-----QKPOEG-----ATCSGPDYMLLP : 576  
 HamHcA : PLSDEGHWTCEIDKFKYKQLEKTSNK--IDRKSTESSVTVPDSLALAEHLKTDQAVASGSKLDLHEYERSCGIPARMLLP : 587  
 PinHcB : TLDERARWFCEIDKFKFQKVPSCPET--IBRSSKSSSVTVDPMSFQSLKQADNAVNGGHDLDSAYERSCGIPDRMLLP : 571  
 PinHcA : TLDERARWFCEIDKFKFQKVPSCPET--IBRSSKSSSVTVDPMSFQSLKQADNAVNGGHDLDSAYERSCGIPDRMLLP : 571  
 PvuHc : NLDERARWLEIDKFKWTKLGDGKIL--IBRSSKSSSVTVDPMSFQSLKQADNAVNGGHDLDSAYERSCGIPDRMLLP : 571  
 PelHc1 : NLDERARWLEIDKFKWRKLANGKIL--IBRSSKSSSVTVDPMSFQSLKQADNAVNGGHDLDSAYERSCGIPDRMLLP : 598  
 PelHc2 : NLDERARWLEIDKFKWTKLANGKIL--IBRSSKSSSVTVDPMSFQSLKQADNAVNGGHDLDSAYERSCGIPDRMLLP : 598  
 PelHc3 : NLDERARWLEIDKFKWTKLANGKIL--IBRSSKSSSVTVDPMSFQSLKQADNAVNGGHDLDSAYERSCGIPDRMLLP : 599  
 CmaHc6 : SFNDEGRWNAIEIDKFKRWVMLHFGHNI--IBRSSHSSSATVPIPSFGLIKRTRNEAIAQNKELHIEEFESGICLPDRFLIP : 569  
 CsaHc : SFNDEGRWNAIEIDKFKRWKLNKSGNI--IBRSSKDFGVTVPDVPSTQTLMDMDEALGSGSALHLEDYESGICLPDRFLIP : 594  
 PvaHc1 : TFDDEGRWNAIEIDKFKRWKLPGGTH--IBRKCSASAVTVDPVPSATLFFKTKKALGGADS--GLKDFESA--TGIPNRFLLIP : 587  
 PvaHc : TFDDEGRWNAIEIDKFKWVSKGCKTS--IBRKSTESSVTVPDVPSTHDLFAEA--EA--GGA---GLAKTESATCLPDRFLIP : 579  
 PinHcC : SFNDEGRWRAIEIDKFKRWVVKHCHHQ--ITRQSTESSVTVPDVPSTGLTLIRADAAISSGCALHLEDYESALCLPDRFLIP : 577  
 SamHc : PINDEGRHYIEIDKFKVAKVNAKCTV--IBRKSSSSSVTIPDREITKVLTRVEDAIAGKVQLTVNKDVRHCYPPDRMLLP : 591

\* 660 \* 680 \* 700 \* 720  
 PlePPO : RKGPEGMVYQLFFVLTDLKDKVDQVAG-PRRCANAVSFCGILDSKFPDQRFMGGFEDRPPRRLQDAEVTSVADVARLS : 683  
 PmoPPO : RGRPEGMVFOLFVLTLDYAQDKVSNPGG-VRRCANAVSFCGMQDAKYPDARFMGGFEDRPPAPLLQGLPVNTTADVARLG : 671  
 TmoPPO : KGTPEGMVFOLFVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRFSMGYFEDRMPRN-----GVDTLQOFLTS- : 662  
 BmoPP01 : KGTTCGYPMVLFVWVSNWDDRVEQDL--VGSONDAASFCGIRDRKYPDRAMGFFEDRPPA-----ATTLSDFLRP- : 663  
 BmoPP02 : KGTACGMPFOLFVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRFSMGYFEDRPPA-----ATTLSDFLRP- : 667  
 BmoPP03 : KGTTCGYPMVLFVWVSNWDDRVEQDL--VGSONDAASFCGIRDRKYPDRAMGFFEDRPPA-----ATTLSDFLRP- : 663  
 MsePP01 : KGTVGGVAFOLFVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRFSMGYFEDRPPA-----ATTLSDFLRP- : 671  
 MsePP02 : KGTACGYPVVLFVWVSNWDDRVEQDL--VGSONDAASFCGIRDRKYPDRAMGFFEDRPPA-----ATTLSDFLRP- : 663  
 OnyHc : KGSAGCFHCFIITDVKTELEKSSK--KPTCQAVSFCGIIIDKLYPDKEMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 626  
 EcaHcB : KQNEFGMKFRFLVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 614  
 EcaHcC : KGNDRGMPFHLVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 617  
 EcaHcA : KQNEKGMDFLFLVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 618  
 LpoHc2 : KGNIKGMDFLFLVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 615  
 EcaHcD : RCKERGMDFFLFLVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 611  
 EcaHcE : KGNHRGMDFFLFLVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 609  
 EcaHcF : RGTYKGMDFLFLVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 614  
 TtrHcA : RGNRKGMPFELFVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 609  
 AauHc6 : RGSKKGMPFELFVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 613  
 EcaHcG : KGTHRGMPFOLFVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 614  
 SpiHc : QCDYLGMPFELFVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 635  
 ScoHc1 : KKYLGMPFELFVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 638  
 ScoHc2 : KKYLGMPFELFVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 646  
 HamHcA : KGTVNGMDFFLFLVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 657  
 PinHcB : KSKPEGMFNLVAVTDGKDTGSDG--DHDHHTHAQCGIHCQYDPDRPLGYELERRIPD-----DRVFDGVS- : 640  
 PinHcA : KSKPEGMFNLVAVTDGKDTGSDG--DHDHHTHAQCGIHCQYDPDRPLGYELERRIPD-----DRVFDGVS- : 640  
 PvuHc : KSKPEGMFNLVAVTDGKDTGSDG--DHDHHTHAQCGIHCQYDPDRPLGYELERRIPD-----DRVFDGVS- : 640  
 PelHc1 : KSKPEGMFNLVAVTDGKDTGSDG--DHDHHTHAQCGIHCQYDPDRPLGYELERRIPD-----DRVFDGVS- : 667  
 PelHc2 : KSKPEGMFNLVAVTDGKDTGSDG--DHDHHTHAQCGIHCQYDPDRPLGYELERRIPD-----DRVFDGVS- : 667  
 PelHc3 : KSKPEGMFNLVAVTDGKDTGSDG--DHDHHTHAQCGIHCQYDPDRPLGYELERRIPD-----DRVFDGVS- : 668  
 CmaHc6 : KGNVKGMDVMMVAITSGADAADV---GLHENTSFNHYGCPDGTYPDKRPHGYELDRHVD-----ERLITGV-S- : 636  
 CsaHc : KKYLGMPFELFVLTLDYEDDKVNGST--EGVCNDAVSCGICDKLYPDRAMGFFEDRPPA-----DLATFVSRSS : 661

```

PvaHc1 : KGNELGLDFDLVVAVTDGAADAADV---GLHENTEFNHYGSHG-VYPDGRPHGYELDRVDP-----IRVFEDL--P- : 653
PvaHc  : KGNDRGLDFDLVVAVTDGADSAVP---NLHENTEFNHYGSHG-VYPDGRPHGYELDRVDP-----IRVFEDL--P- : 645
PinHcC : KQQAQGMDFNLVVAVTDGRTDAALD---DLHENTKFIHYGYDR-QYPDGRPHGYELDRVDD-----IRVFEDL--P- : 643
SamHc  : KGRRLGMPFPLFVLLIDYFKDKVNLPLP-FDYDYGGSVSYCGTLGHRYPDAKPMGFEDRRRI-----IQDSF--T-K- : 659

```

```

* 740
PlePPO : NMTVQDITITFLTTASRSRHDGPI*- : 707
PmoPPO : NAFMHDITIKFLGKEKLN*----- : 688
TmoPPO : NMRVQDVTIKFTNRTVVRPKSRN*--- : 684
BmoPPO1 : NMAVRDCIVRF TDRTRQRGQQG*--- : 685
BmoPPO2 : NMGLQDITITQLQNVTEPNRPNPPMSV : 693
BmoPPO3 : NMAVRDCIVRF TDRTRQRGQQG*--- : 685
MsePPO1 : NMGLQDITIKLSDVTEPNRPNPPA*- : 695
MsePPO2 : NMAVRDCSIQFSDTTVERGQQG*--- : 685
OnyHc  : NMKIFDITITLHREK----- : 641
EcaHcB : NMHFSEVITITHHQ*----- : 627
EcaHcC : NVSFSQIKITQHH*----- : 629
EcaHcA : NMNISHVITVRFQD*----- : 631
LpoHc2 : NMFIKDITIKFHE----- : 628
EcaHcD : NMAFQETITIQYEGHKK*----- : 627
EcaHcE : SMSCTDVRITKYTDIK*----- : 624
EcaHcF : NMSFTDVKITQFKDQV*----- : 629
TtrHcA : NMGVSDITIKQFMG----- : 622
AauHc6 : NMGLTDITIKFHHG----- : 626
EcaHcG : NMSLTDVITIQYVGHE*----- : 629
SpiHc  : NMCDAITVITKFSGKNKDH----- : 653
ScoHc1 : NMYYGDVITIQFTGETVTH----- : 656
ScoHc2 : NMTIATDVIITKFTGEFLPPKGD----- : 668
HamHcA : NINVTHTVITVFEKEEH*----- : 672
PinHcB : NIKHVVVKITVHHLEHHD----- : 657
PinHcA : NIKHVVVKITVHHLEHHD----- : 657
PvuHc  : NIKHALVKITVHDPELRA----- : 657
PelHc1 : NIKHALVKITVHDPELRA----- : 684
PelHc2 : NIKHALVKITVHDPELRA----- : 684
PelHc3 : NIKHALVKITVHDPELRA----- : 685
CmaHc6 : NFKHIQVKITVFHHA*----- : 649
CsaHc  : NFKAVDVKITVYHVEDH----- : 676
PvaHc1 : NFGHIHLKITVFNHGEHIIH----- : 671
PvaHc  : NFKHIQVKITVFNHGEHIIH*----- : 662
PinHcC : NFKQRTVKITVYSHEGVDGG----- : 661
SamHc  : NIYQRDVTITIKGGSV*----- : 674
n      5

```

## **G. Literatur**

Averof M., Akam M (1995). Insect-crustacean relationships: insights from comparative developmental and molecular studies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci* **347**, 293-303

Áspan A. and Söderhall K. (1991). Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by endogenous serine proteinase. *Insect. Biochem.* **21**,363-373

Ballard J.W., Olsen G.J., Faith D.P., Odgers W.A., Rowell D.M. and Atkinson P.W. (1992). Evidence from 12S ribosomal RNA sequence that onychophorans are modified arthropods. *Science* **258**, 1345-1348

Beintema J.J., Stam W.T., Hazes B. and Smidt M.P. (1994). Evolution of the arthropod hemocyanin and insect storage proteins (hexamerins). *Mol. Biol. Evol.* **11**, 493-503

Bijholt M. M. C., van Heel M. C. and von Bruggen E. F. J. (1982). Comparison of 4x6-mer hemocyanins from three different arthropods using computer alignment and correspondence analysis. *J. Mol. Biol.* **161**, 139-153

Boisset N., Taveau J.-C., and Lamy J.-N. (1990) An approach to the architecture of *Scutigera coleoptrata* hemocyanin by electron microscopy and image processing. *Biol. Cell.* **86**, 73-84

Boore J.L., Lavrov D.V., and Brown W.M.. (1998). Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* **392**,667-668

Börner C. (1909). Neue Homologien zwischen Crustaceen und Hexapoden. *Zool. Anz.* **34**, 100-124

Briggs D.E.G., Weedon M.J., and White M.A. (1993). Arthropoda (Crustacea excluding Ostracoda). *The fossil record* **2**, 321-342. Chapman and Hall, London.

Brusca and Brusca ( 1990). *Invertebrates*. Sinauer, Sunderland, Mass.

- Burmester T. (1999). Identification, molecular cloning and phylogentic analysis if a non-respiratory pseudo-hemocyanin of *Homarus americanus*. J. Biol. Chem. **274**, 13217-13222
- Burmester T. and Scheller K. (1996). Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin and insect hexamerin and dipteran arylphorin receptor. J. Mol. Evol. **42**, 713-728
- Burmester T. (2000). Hämocyanine und Globine – Proteinfamilien im evolutiven Wandel (Habilitationsschrift)
- Burmester T. and Hankeln T (1999). A globin gene of *Drosophila melanogaster*. Mol. Biol. Evol. **18**, 1809-1811
- Burmester T., Weich B., Reinhardt S., and Hankeln T. (2000). A vertebrate globin expressed in the brain. Nature **407**, 520-523
- Burmester T. (2001). Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. Mol. Biol. Evol. **18**, 185-195
- Burmester, T. (2002) Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. J. Comp. Physiol. B (in press)
- Burmester T., Ebner, B., Weich, B. and Hankeln, T (2002). Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. Mol. Biol. Evol. **19** (in press)
- Campbell N. A. (1997). Biologie. Markl J. (ed.), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford
- Cuff M.E., Miller K.I., van Holde K.E., and Hendrickson W.A. (1998). Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. J. Mol. Biol. **278**, 855-870
- Dayhoff M. O., Schwartz R. M. and Orcutt B. C. (1978). A model of evolutionary change in proteins. In: Atlas of Protein Sequence Structure (Dayhoff M. O., Ed.) **5/3**, 345-352. National Biomedical Research Foundation, Washington DC.

Decker H. and Tuczek F. (2000). Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *TIBS* **25**, 392-397

Decker H., (2001). SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *J Biol Chem.* **276**(21), 17796-17799.

Decker H. and Rimke T. (1998). Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J.Biol.Chem.* **273**, 25889-25892

Destoumieux-Garzón D., Saulnier D., Garnier J., Jouffrey C., Bulet P., and Bachere E. (2001). Crustacean Immunity: Antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin to microbial challenge. *J. Biol. Chem.* (in press)

Dickerson R.E. and Geis I. (1983). Hemoglobin: Structure , function, evolution and pathology. Benjamin/Cummings Publ. Co., Ca

Dohle W. (1997). Myriapod-insect relationships as opposed to an insect-crustacean sister group relationship. In R.A. Fortey and R.H. Thomas, eds. *Arthropod relationships. Systematic Association Special Vol., Ser 55*, 305-315

Drexel R., Siegmund S., Schneider H.J., Linzen B., Gielens C., Lontie R., Kellermann J., and Lottspeich F. (1987). Complete sequence of a functional unit from a molluscan hemocyanin (*Helix pomatia*). *Biol.Chem. Hoppe-Seyler* **368**, 617-635

Durstewitz G. and Terwilliger N.B. (1997). cDNA cloning of a developmentally regulated hemocyanin subunit in the crustacean *Cancer magister* and phylogenetic analysis of the hemocyanin gene family. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 266-276

Ellerton H.D., Ellerton N.F., and Robinsom H.A. (1983). Hemocyanin - a current perspective. *Prog Biophys Mol Biol.* **41**(3):143-248.

Fahrenbach W.H. (1970). The cyanoblast: hemocyanin formation in *Limulus polyphemus*. *J. Cell Biol.* **44**, 445-453

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.

*Evolution* **39**, 783-791



---

Felsenstein J. (2000). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the Author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Friedrich and Tautz (1995). Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. *Nature* **376**, 165-167

García-Machado E., Pempera M., Dennebouy N., Oliva-Suarez M., Mounolou J.C., and Monnerot M. (1999). Mitochondrial genes collectively suggest the paraphyly of Crustacea with respect to Insecta. *J. Mo. Evol.* **49**, 142-149

Gaykema W. P. J., Hol W. G. J., Vereijken J. M., Soeter N. M., Bak H. J. and Beintema J. J. (1984). 3,2 Å Structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Nature (London)* **309**, 23-29

Gaykema W. P. J., Volbeda A., and Hol W. G. J. (1985). Structure determination of *Panulirus interruptus* hemocyanin at 3,2 Å resolution. Successful phase extension by sixfold density averaging. *J. Mol. Biol.* **187**, 255-275

Gebauer and Markl (1999) Identification of four distinct subunit types in the unique 6x6 hemocyanin of the centipede *Scutigera coleoptrata*. *Naturwissenschaften* **86**, 445-447

Giribet G., Carranza S., Baguna J., Riutort M., and Ribera C. (1996). First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. *Mol. Bio. Evol.* **13**, 76-84

Giribet and Ribera (2000). A review of arthropd phylogeny: new data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. *Cladistics* **16**, 204-231

Graur and Li (1999). *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.

Hagermann L. (1983). Haemocyanin concentration of juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding conditions. *Mar. Biol.* **77**, 11-19

Hardison R.C. (1996). A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5675-5679

Hazes B., Magnus K. A., Bonaventura C., Bonaventura J., Dauter Z., Kalk K. H., Hol W. G. J. (1993). Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2,18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Sci.* **2**, 597-619

Hennig W. (1998). *Genetik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Hilken G. (1998). Vergleich von Tracheensystemen unter phylogenetischem Aspekt. *Verh. naturwiss. Ver. Hamburg* **37**, 5-94

Hodgson and Spicer (2001). Subunit compositions of crustacean haemocyanins are species-specific: evidence from non-decapod species. *C. Biochem. and Phys. A* **128**, 873-888

Hou X. and Berström J. (1995). Cambrian lobopodians – ancestors of extant onychophorans ? *Zool. J. of the Linnean Soc.* **114**, 3-19

Hughes A.L. (1999). Evolution of the arthropod prophenoloxidase/hexamerin protein family. *Immunogenetics* **49**, 106-114

Jacobs M.P., Lontie R., and Preaux G. (1984). Isolation of an active haemocyanin-mRNA-containing fraction from *Cancer pagurus*. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **92**, B30

Jaenicke E., Decker H., Gebauer W., Markl J., and Burmester T. (1999). Identification, structure and properties of hemocyanin from diplopod Myriapoda. *J. Biol.Chem.* **274**, 29071-29074

Kaestner A. (1993). *Lehrbuch der speziellen Zoologie; Band I Wirbellose Tiere; 4. Teil: Arthropoda*. Gruner H.-E.(ed); Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart New York

Kawabata T., Yasuhara Y., Ochiai M., Matsuura S., and Assida M. (1995). Molecular cloning of insect prophenoloxidase: a copper containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7774-7778

Kimura M. (1983). *The neutral theory of melocular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, England

Kobert R. (1903). Über Hämocyanin nebst einigen Notizen über Hämerythrin. Pflueger's Arch. Physiol. **98**, 411-427

Kurtz D.M. jr (1999). Oxygen-carrying proteins: three solutions to a common problem. Essays Biochem. **34**, 85-100

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

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

Linzen B. , Soeter N. M., Riggs A. F., Schneider H. J., Schartau W., Moore M. D., Behrens P. Q., Yokota E., Nakashima H., Takagi T., Nemoto T., Vereijken J. M., Bak H. J., Beintema J. J., Volbeda A., Gaykema W. P. J., Hol W. G. J. (1985). The structure of arthropod hemocyanins. Science **229**, 519-524

Loewe R. (1978). Hemocyanins in spiders. V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin. J. Comp. Physiol. B **128**, 161-168

Lottspeich F und Zorbas H.(1998). Bioanalytik, Spektrum Verlag

Mangum C. P., Scott J. L., Black R. E. L., Miller K. I., and van Holde K. E. (1985). Centipedal hemocyanin: its structure and its implications for arthropod phylogeny. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 3721-3725

Mangum C.P.(1983). Oxygen transport in the blood. The Biology of Crustacea, Vol. 5 (Bliss D.E. and Mantel L.H., eds.) pp. 373-429, Academic Press

Mangum C.P. and Godette G. (1986). The hemocyanin of the uniramous arthropods. In B Linzen, ed. Invertebrate oxygen carriers. Springer Verlag Berlin. 276-280

Mangum C.P. (1992). Physiological function of hemerythrin. Adv. Comp. Environ. Physiol. **13**, 173-192

Mangum C.P. (1998). Major events in the evolution of the oxygen carriers. *Amer. Zool.* **38**, 1-13

Markl J (1980) Hemocyanins in spiders, XI. The quaternary structure of Cupiennius hemocyanin. *J Comp Physiol B* 140: 199-207

Markl J., Kempter B. (1981). Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. In: *Invertebrate oxygen-binding proteins*, Lamy J., Lamy J. (eds.), Marcel Dekker New York, 125-137

Markl J., Decker H., Stöcker W., Savel A., and Linzen B. (1981b). On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* **362**, 185-188

Markl J. (1986). Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol. Bull.* **171**, 90-115

Markl J., Stöcker W., Runzler R., and Precht E. (1986). Immunological correspondences between the hemocyanin subunits of 86 arthropods: Evolution of a multigene protein family. In: *Invertebrate Oxygen Carriers*, Linzen B. (ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 281-292

Markl J, Stumpp S, Bosch FX, Voit R (1990) Hemocyanin biosynthesis in a tarantula, studied by in situ hybridization and immunocytochemistry. In: *Invertebrate dioxygen carriers* (Preaux G, Lontie R, eds). University Press, Louvain, Belgium, pp 497-502

Markl J., and Decker H. (1992). Molecular structure of the arthropod hemocyanins. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, **13**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 325-376

Markl J. (1996). Blaues Blut - Struktur, Funktion und Evolution der Hämocyanine. *Chemie in unserer Zeit* **30**, 6-18

Müller G., Ruppert S., Schmid E., and Schütz G. (1988). Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. *EMBO J.* **7**, 2723-2730

---

Nicholas K.B. and Nicholas H.B. (1997). GeneDoc: analysis and visualisation of genetic variation. [http:// www.psc.edu/ biomed/genedoc/](http://www.psc.edu/biomed/genedoc/)

Pagel M. (1999). Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* **401**, 877-884

Preaux G., Vandamme A., De Bethune B., Jacobs M-P. Lontie R. (1986). Haemocyanin-mRNA-rich fractions of cephalopodan Decabrachia and of Crustacea, their in vivo and in vitro translation. In: Linzen B (ed) *Invertebrate oxygen carriers*. Springer, Berlin, pp 485-488

Presnell and Cohen (1989). Topological distribution of four-alpha-helix bundles. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**(17), 6592-6596.

Quagliariello G. (1923). Das Hämocyanin. *Naturwissenschaften* **14**, 261-268

Rajulu G.S. (1969). Presence of hemocyanin in the blood of a centipede *Scutigera longicornis* (Chilopoda: Myriapoda). *Curr. Sci. Bangalore* **38**, 168-169

Regier J.C and Shultz J.W. (1997). Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of the Crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods. *Mol. Biol Evol.* **14**, 902-913

Richey B., Decker H., and Gill S.J. (1985). Binding of oxygen and carbon monoxide to arthropodan hemocyanin: an allosteric analysis. *Biochemistry* **24**, 109-117

Robinson R.A (1990). Earliest-known uniramious arthropods. *Nature* **343**, 163-164

Saitou N and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 1406-1425

Sambrook J. and Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sánchez D., Ganfornina M.D., Gutiérrez G., and Bastani M.J. (1998). Molecular characterisation and phylogenetic relationship of a protein with oxygen-binding capacity in the grasshopper embryo. A hemocyanin in insects ? *Mol. Biol. Evol.* **15**, 415-426

Savel-Niemann A., Markl J., and Linzen B. (1988). Hemocyanins in spiders. XXII. Range of allosteric interaction in a four-hexamer hemocyanin. Co-operativity and Bohr effect in dissociation intermediates. *J. Mol. Biol.* **204**, 385-395

Schönenberger N., Cox J.A., and Gabbiani G. (1980). Evidence for hemocyanin formation in the compound eye of *Squilla mantis* (Crustacea Stomatopoda). *Cell Tissue Res.* **205**, 397-109

Sellos D.Y., Lemoine S., and Van Wormhoudt A. (1997). Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Lett.* **407**, 153-158

Senozan N.M. and Briggs M. (1989). Hemocyanin levels in the giant keyhole limpet, *Megathura crenulata*, from the coast of California. *Comp. Biochem. Physiol.* **94A**, 195-199

Shear W.A. (1997). The fossil record and evolution of the Myriapoda. In R.A. Fortey and R.H. Thomas, eds. *Arthropod relationships. Systematic Association Special Vol., Ser. 55*, 211-219

Shultz J.W and Regier J.C (2000). Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein-encoding genes supports a crustacean+hexapod clade. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **267**, 1011-1019

Snodgrass R.E. (1938). Evolution of annelida, onychophora and arthropoda. *Smithson. Misc. Coll.* **138**, 1-77

Söderhall K. and Cerenius L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 23-28

Spears T. and Abele L.G. (1997). Crustacean phylogeny inferred from 18S rDNA. In R.A. Fortey and R.H. Thomas, eds. *Arthropod relationships. Systematic Association Special Vol., Ser. 55*, 169-187

Stuempke H. (1998). *Bau und Leben der Rhinogradentia*. Gustav Fischer Verlag, Jena

- Stoeva S., Dolashka P., Hristova R., Genov N., and Voelter W. (1999). Subunit composition and N-terminal analysis of arthropod hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **122**, 69-75
- Swofford D.L., Olsen G.J., Wadell P.J., and Hillis D.M. (1996). Phylogenetic inference. In: *Molecular systematics*, Sinauer Ass., Inc., MA. Pp. 407-514
- Telfer W.H. and Kunkel J.G. (1991). The function and evolution of insect storage hexamers. *Ann. Rev. Entomol.* **36**, 205-228
- Terwilliger N.B., Dangott L.J., and Ryan M.C. (1999). Cryptocyanin, a crustacean molting protein, and evolutionary links to arthropod hemocyanin and insect hexamerins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2013-2018
- Terwilliger N.N (1998). Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *J. of Exp. Biol.* **201**, 1085-1098
- Turbeville J.M., Pfeifer D.M., Field K.G., and Raff R.A. (1991). The phylogentic status of arthropods, as inferred from 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **8**, 669-686
- van Holde K. E., and Miller K. I. (1995). Hemocyanins. *Advances in Protein Chemistry* **47**, 1-81
- Vinogradov S.N. (1985). The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocrucorins and chlorocruorins). *Comp. Biochem. Physiol. B.* **82**, 1-15
- Voit R., Feldmaier-Fuchs G., Schweikardt T., Decker H., Burmester T. (2000). Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. *J. Biol. Chem.* **275**, 39339-39344
- Volbeda A., Hol W. G. J. (1989). Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3,2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **209**, 249-279
- Wheeler W.C. (1990). Nucleid acid sequence phylogeny and random outgroups. *Cladistics* **6**, 363-368

---

Wilson A.C., Carlson S.S., and White T.J. (2000). The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to brachiopods? *Mol. Biol. Evol.* **17**, 863-874

Wyman J. (1984). Linkage graphs: a study in the thermodynamics of macromolecules. *Q. Rev. Biophys.* **17**, 453-488

Xylander W. (1996). The phenoloxidase from the hemolymph of Diplopoda. *Acta Myriapodologica*. Vol **169**, 411-420. Mémoires du Museum national d'Histoire naturelle, Paris.

Yager J. (1991). The Remipedia (Crustacea): recent investigations of their biology and phylogeny. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **84**, 261-269



# Lebenslauf

## **Persönliche Daten:**

Name: Kristina Kusche  
Geb. am / Ort: 22.09.1972 in Waiblingen / Baden Württemberg  
Adresse: Feldbergplatz 15, 55118 Mainz  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## **Schulbildung:**

August 1978 – Juni 1982 Grundschule Wilgartswiesen  
August 1982 – Juni 1992 Max Slevogt Gymnasium Landau mit Abiturabschluß

## **Hochschule:**

SS 1993 Immatrikulation an der Johannes Gutenberg – Universität  
Mainz im Fach Biologie  
17.07.1995 Vordiplomprüfung  
25.06.1999 Diplomprüfung  
Seit Juli 1999 Promotion im Institut für molekulare Tierphysiologie der  
Johannes Gutenberg – Universität bei Prof. Dr. J. Markl

## **Auslandsaufenthalt:**

August 1996 – Jan. 1997 Studium an der Universität Umeå in Schweden  
(ERASMUS - Stipendium)

## **Praktikum:**

Sept. 1992 – März 1993 Pflegepraktikum am Vincentius Krankenhaus in Landau

„Heute beschäftigen wir uns mit  
der Phylogenie der Tausendfüssler“

