

„Molekulare Evolution der Intermediärfilament-Proteine
des Flussneunauges *Lampetra fluviatilis*“

D i s s e r t a t i o n
Zur Erlangung des Grades
„D o k t o r
d e r N a t u r w i s s e n s c h a f t e n“

Am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Jan Schultess
geb. in Berlin

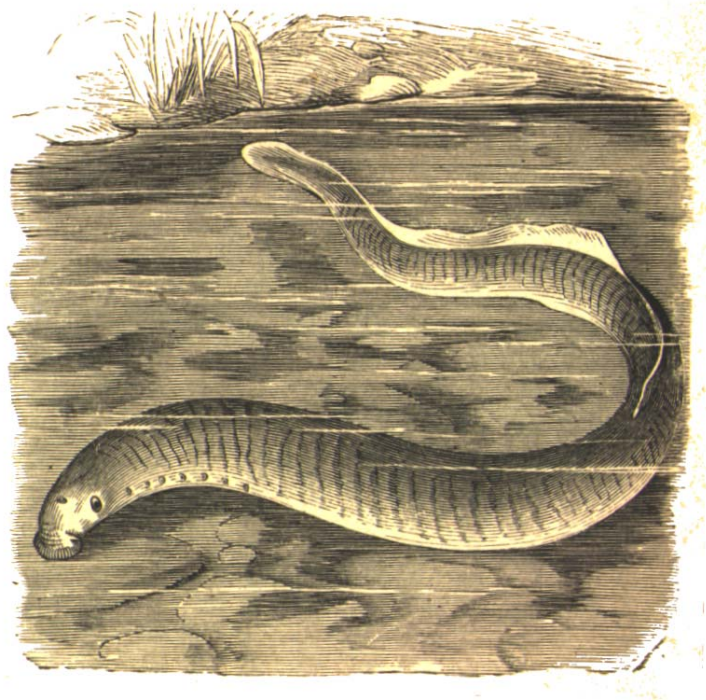
Mainz, 2001

Dekan und

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2002



Denn Augen haben und Betrachten ist nicht dasselbe

(Augustinus)

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1.	Intermediärfilamente – vielfältige Netzwerke der Zelle	1
2.	IF-Proteine. Struktur und Klassifizierung	1
2.1	Keratine	4
2.2	Die Typ III Proteine Desmin und Vimentin	5
2.3	Die α - und γ -IF-Proteine des Pazifischen Schleimaals	6
3.	Die Evolution der IF-Proteine	7
4.	Ziel der Arbeit	8
B	Material und Methoden	9
1.	Versuchstiere	9
1.1	Systematische Stellung von <i>Lampetra fluviatilis</i>	9
1.2	Lebensweise von <i>Lampetra fluviatilis</i>	10
1.3	Herkunft, Hälterung und Töten der Tiere	10
1.4	Präparation der Flussneunaugen	10
2.	Chemikalien	10
3.	Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen und Arbeitsbedingungen	11
4.	Antikörper	11
5.	Allgemeine molekularbiologische Methoden	12
5.1	Nukleinsäurepräzipitation	12
5.2	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	12
5.3	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	12
5.4	Isolierung von Plasmid-DNA	13
5.5	Restriktionsverdau von dsDNA	13
5.6	Gelelektrophorese	14
5.7	Blotten von Nukleinsäuren	15
5.8	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	16
5.9	Markierung von DNA	17
6.	Allgemeine mikrobiologische Methoden	18
6.1	Bakterien, Phagen und Plasmid-Vektoren	18
6.2	Nährmedien und Agarplatten	19
6.3	Glycerinkultur	20

6.4	Bakterienkultur	20
6.5	Kompetente Bakterien	20
6.6	Transformation kompetenter Bakterien	21
7.	Präparation von genomischer DNA	21
8.	Präparation von RNA	21
8.1	Gesamt-RNA-Präparation	21
8.2	Aufreinigen der Gesamt-RNA	24
8.3	Messenger-RNA-Isolierung	24
9.	cDNA-Banken	24
9.1	ZAP-Express [®] Synthese-Kit	26
9.2	SMART [™] cDNA Synthese-Kit von Clontech	28
9.3	Verpackung und Bestimmung des Primärtiters	29
9.4	Amplifizierung der cDNA-Primärbank	30
10.	Plauefilterhybridisierung („Screening“)	30
10.1	Antikörper-Screening	31
10.2	DNA-Sonden-Screening	31
11.	In vivo-Excision und in vivo-Konversion	32
11.1	<i>In vivo</i> -Excision	33
11.2	<i>In vivo</i> -Konversion	33
12.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
12.1	Primer	37
12.2	PCR mit genomischer DNA	37
12.3	PCR mit cDNA und Plasmiden	37
12.4	PCR mit RNA (RT-PCR)	38
12.5	Klonierung von PCR-Fragmenten	39
13.	DNA-Sequenzierung	40
14.	Sequenzauswertung am Computer	40
14.1	Programme	40
14.2	Molekulare Phylogenie	41
15.	Biochemische Methoden	42
15.1	Biochemische Präparation der Intermediärfilamente (Cytoskelettpräparation)	42
15.2	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Minigelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
15.3	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
15.4	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose- und PVDF-Membranen	48
15.5	Immunblot	49

15.6	Biotinylierung von Proteinen	50
15.7	Complementärer-Keratin-Blot-Bindungs-Test (CKBB-Test)	51
16.	Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase	52
17.	„Peptide Mass Mapping“ mit MALDI-Massen-Spektrometrie (MALDI-MS)	52
C	Ergebnisse	53
1.	Einführung	53
2.	Sequenzierung und Expression von Keratinen und keratinartigen Proteinen	55
2.1	cDNA-Klone, die für Typ I-Keratine codieren (Lfl-K10, Lfl-K11, Lfl-K18)	55
2.2	cDNA-Klone, die für Typ II-Keratine codieren (Lfl-K1, Lfl-K2, Lfl-K3, Lfl-K8)	58
2.3	cDNA-Klone, die für α - und γ -Keratine codieren	60
2.4	Expressionsmuster der Keratine von <i>Lampetra fluviatilis</i>	65
3.	Sequenzierung und Expression der Typ III-IF-Proteine Vimentin und Desmin	68
3.1	Für Vimentin und Desmin codierende cDNA-Klone	68
3.2	Expressionsmuster von Vimentin und Desmin beim Neunauge	72
4.	cDNA-Klon, der für ein Typ IV-IF-Protein codiert (Lfl-NF_L)	74
5.	Massenspektrometrische Identifizierung der sequenzierten IF-Proteine (MALDI-MS)	75
6.	Katalog der sequenzierten IF-Proteine von <i>Lampetra fluviatilis</i>	79
D	Diskussion	81
1.	Expression der IF-Proteine von <i>Lampetra fluviatilis</i>	81
2.	Molekulare Evolution der IF-Proteine	83
2.1	Die IF-Typen der Chordaten	87
2.2	Die Typ I-Keratine des Neunauges – Frühformen von K18?	88
2.3	Die Typ II-Keratine des Neunauges – K8 als Leitmotiv der Typ II-Evolution	91
2.4	Die IF-Proteine vom Typ III- und Typ IV und der Ursprung des Vimentins	96
3.	Kα und Kγ – keratinartige IF-Proteine der Agnathen	103
E	Zusammenfassung	110
F	Anhang	112
1.	Abkürzungen	112
2.	Verwendete Kurzbezeichnungen der IF-Proteine und EMBL-Accession-Nr.	113
3.	Verwendete PCR-Primer	115
4.	IUPAC-Code Nukleinsäuren	115

5. IUPAC-Code und Masse der Aminosäuren	116
6. Der genetische Code für Eukaryoten	116
7. MALDI-MS-Tabellen	117
7.1 Typ I-Keratine	117
7.2 Typ II-Keratine	120
7.3 Keratinartige Proteine	124
7.4 Typ III-Proteine	125
8. DNA-Sequenzen	128
8.1 Typ I-Keratine	128
8.2 Typ II-Keratine	130
8.3 Keratinartige Proteine	132
8.4 Typ III-Proteine Vimentin und Desmin	137
8.5 Typ IV L-Neurofilament-Protein (light)	138
9. Internetadressen	138
10. Herkunftsnachweis der Neunaugen	139
G Literatur	140

A Einleitung

1. *Intermediärfilamente – vielfältige Netzwerke der Zelle*

Zusammen mit den Aktinen (\varnothing 7-10 nm) und den Mikrotubuli (\varnothing 20-25 nm) bilden die Intermediärfilamente (IF; \varnothing 8-16 nm) das Cytoskelett der Chordatenzellen. Während die beiden erstgenannten als sogenannte Mikro- und Makrofilamente hauptsächlich für Bewegungsvorgänge in der Zelle zuständig sind, bauen die Intermediärfilamente komplexe Protein-Netzwerke innerhalb der Zelle und an der Zellkerninnenwand auf; sie haben Kontakt zu Desmosomen in der Zellwand, interagieren mit einer Vielzahl von Proteinen und cytoplasmatischen Strukturen und sind daneben maßgeblich für die mechanische Stabilität und Formgebung der Zelle verantwortlich. Im Gegensatz zu den auf globulären Monomeren basierenden, polaren Filamenten der Mikrotubuli und der Aktine setzen sich die unpolaren Intermediärfilamente aus faserigen Skleroproteinen – den IF-Proteinen – zusammen. Diese zeigen im Gegensatz zu den evolutiv hoch konservierten Proteinen der beiden anderen Filamenttypen eine hohe Diversität, die sich in gewebe- und entwicklungsspezifischer Expression äußert; eine Eigenschaft, die sie zu molekularen Markern in der Entwicklungsbiologie und Pathologie macht (Lazarides, 1982; Osborn und Weber, 1983; Kartenbeck, 1989; LaFlamme und Dawid, 1990). Die IF-Proteine werden von einer großen Multigenfamilie codiert. Die Sequenzierung des Genoms des Menschen im Rahmen des humanen Genomprojekts erbrachte jetzt den Nachweis, dass dort 65 Gene für IF-Proteine codieren, davon 49 für Keratine, die größte Untergruppe innerhalb der IF-Proteine (Hesse et al., 2001).

2. *IF-Proteine. Struktur und Klassifizierung*

Obwohl zwischen den unterschiedlichen IF-Proteinen erhebliche Differenzen bezüglich ihrer relativen Molekülmassen und isoelektrischen Punkte, vor allem aber ihrer Primärstrukturen bestehen, besitzen doch alle die gleiche Sekundärstruktur aus drei Domänen (Geisler und Weber, 1981; Geisler und Weber, 1982). Eine zentrale, in ihrer Primärstruktur sehr konservierte, helikal gewundene Stab- oder Rod-Domäne wird aminoterminal von der „Kopf“-Region (Head) und carboxyterminal von der „Schwanz“-Region (Tail) flankiert. Die beiden peripheren Domänen sind nicht-helikale und variieren stark in Länge und Sequenz (Hanukoglu und Fuchs, 1982; Hanukoglu und Fuchs, 1983; Steinert und Roop, 1988). Die hochkonservierte, aus ca. 310 Aminosäuren (bei Laminen 350-360 Aminosäuren) bestehende Rod-Domäne weist vier große α -helikale Abschnitte auf (1A, 1B, 2A, 2B), die durch drei nicht-helikale Lücken- oder „Linker“-Sequenzen (L1, L12, L2) voneinander getrennt werden (Conway und Parry, 1988; Fuchs und Weber, 1994; Abb. 1).

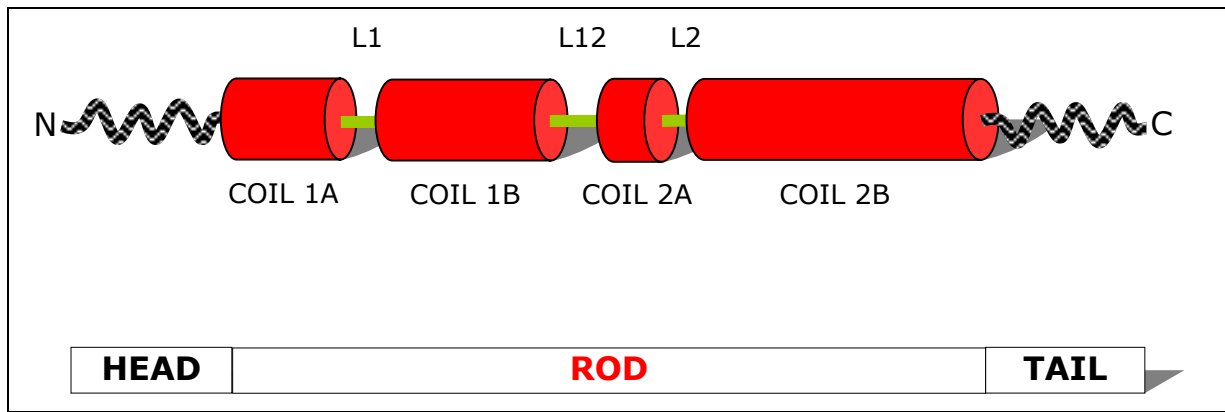


Abb. 1 Helikale Abschnitte und allgemeine Domänenstruktur der IF-Proteine; die typischen IF-Protein-Domänen sind farblich hervorgehoben. Die **schwarzen** gewellten Bereiche stellen die nicht-helikale Head-Domäne sowie die nicht-helikale Tail-Domäne dar; **rot** unterlegt und zylinderförmig sind die helikalen Bereiche (Coil 1A, 1B, 2A, 2B) der zentralen Rod-Domäne. Diese sind durch drei nicht-helikale Verbindungen („Linker“; L1, L12, L2) voneinander getrennt (**grün**).

Die Primärstruktur der helikalen Abschnitte der Rod-Domäne lässt eine Regelmäßigkeit in der Aminosäureanordnung erkennen. Sieben Aminosäuren (= Heptade) bilden eine sich wiederholende Grundeinheit der Form $(a-b-c-d-e-f-g)_n$, in der zu 75% jede erste (a) und vierte (d) Position von einer hydrophoben Aminosäure besetzt wird (Hanukoglu und Fuchs, 1982; Steinert und Roop, 1988). Auf der Oberfläche der α -helikalen Rod-Region entsteht dadurch ein hydrophobes Band, welches die parallele Aneinanderlagerung zweier Monomere zu einer superhelikalen, dimeren „coiled-coil“-Konformation ermöglicht. Die erste Stufe im hierarchisch gegliederten Prozess der Selbstassemblierung der Intermediärfilamente ist die Ausbildung dieser dimeren Funktionseinheit (Hatzfeld und Franke, 1985; Hatzfeld et al., 1987; Coulombe et al., 1990; Coulombe und Fuchs, 1990; Steinert, 1990; Hatzfeld und Weber, 1990a; Hatzfeld und Burba, 1994). Je zwei solcher Dimere lagern sich dann antiparallel und leicht versetzt zueinander zu Tetrameren zusammen, welche zu 2-3 nm dicken Protofilamenten polymerisieren, von denen vermutlich wiederum jeweils zwei zu 4-5 nm starken Protofibrillen aggregieren (Geisler et al., 1985; Steinert, 1991a; Steinert, 1991b). Zwei bis sechs (meistens vier) umeinandergewickelte Protofibrillen bilden letztlich die 8-16 nm dicken Intermediärfilamente (Abb. 2). Möglicherweise alterniert in jeder subfilamentösen Hierarchieebene die Rechts- und Linkswindung des jeweiligen Strangs (von der rechtsgängigen α -Helix des Monomers bis hin zur linksgewundenen Protofibrille (Parry und Steinert, 1999)). Die Details des Aufbaus der Filamente sind jedoch bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt (Geisler et al., 1985; Coulombe und Fuchs, 1990; Steinert et al., 1993a; Steinert et al., 1993b; Kammerer et al., 1998). Röntgenstrukturen von IF-Proteinen gibt es bisher noch nicht, die ersten Versuche, Fragmente von Vimentinfilamenten zu kristallisieren, verliefen jedoch erfolgreich (Herrmann und Aebi, 2000; Herrmann et al., 2000; Strelkov et al., 2001).

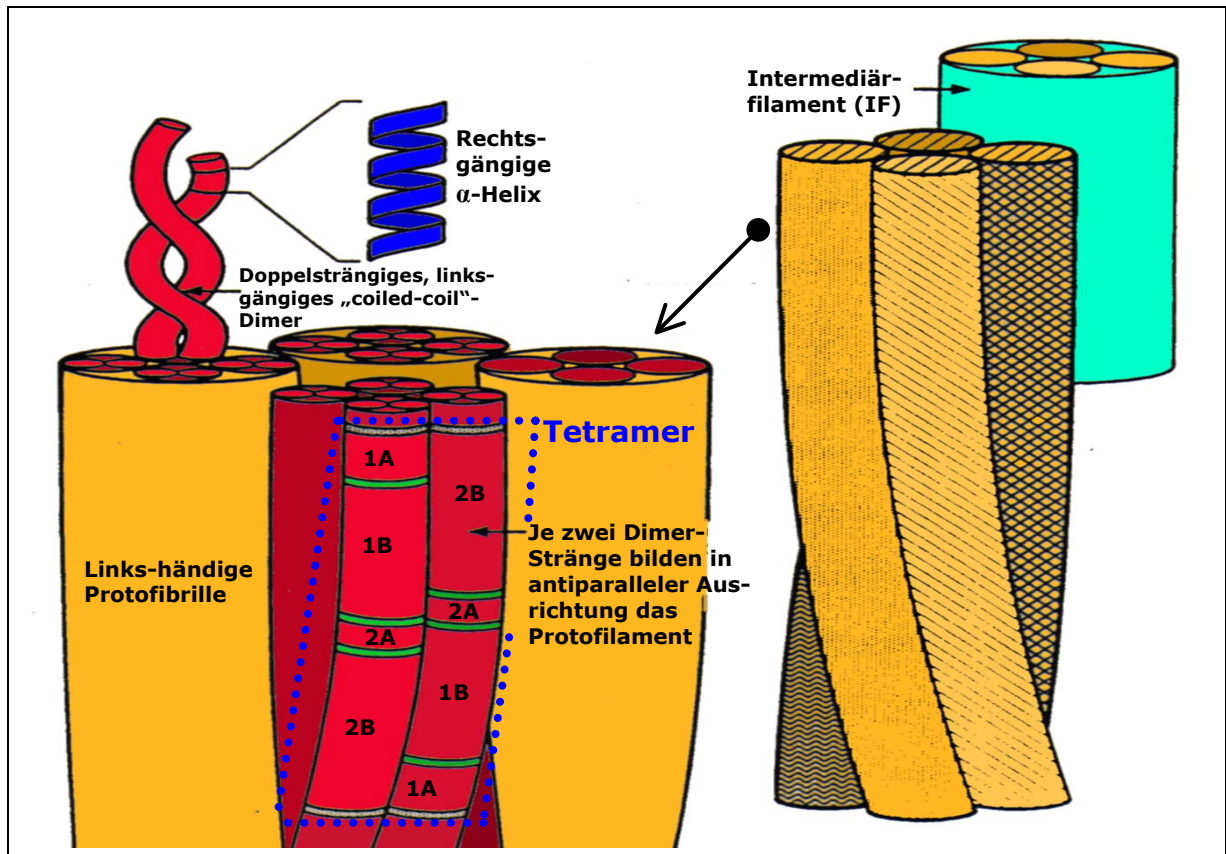


Abb. 2 Schema des wahrscheinlichen Aufbaus von Intermediärfilamenten. Zwei parallel angeordnete IF-Proteine mit überwiegend α -helikaler Struktur (Rod-Domäne) bilden die linksgängige dimere coiled-coil-Grundstruktur. Zwei dieser Dimer-Stränge ordnen sich antiparallel und etwas versetzt zum rechts-gängigen Protofilament an, das aus einer linearen Abfolge von Tetrameren besteht. Je zwei Protofilamente bilden eine Protofibrille, die wiederum eine linksgewundene Orientierung besitzen kann. Abbildung nach Parry und Steinert (1999).

Die Intermediärfilament-Proteine der Vertebraten werden anhand ihrer Sequenzhomologien und ihrer weitgehend gewebespezifischen Expression zur Zeit in sechs verschiedene Typen unterteilt (Parry und Steinert, 1999). Die Keratine bilden dabei die ersten beiden Typen, Desmin, Vimentin, Peripherin und saures Gliofilament-Protein (GFAP) den dritten Typ. Zu dieser Gruppe wird auch Plasticin gezählt, welches sowohl im Goldfisch als auch im Zebrafisch in den optischen Neuronen während der Regenerationsphase des Sehnervs exprimiert wird (Glasgow et al., 1992; Asch et al., 1998; Markl und Schechter, 1998). Der vierte Typ wird von den Neurofilament-Proteinen (NF-Proteine) gebildet, die in Neuronen des gesamten Nervensystems auftreten und sich wiederum in drei Subtypen unterteilen: sie können in L (light), M (medium) und H (heavy) NF-Proteine differenziert werden, mit Molekülmassen zwischen 62 und 110 kDa (Fliegner und Liem, 1991). Das in Ganglienzellen der Retina von Goldfisch und Zebrafisch gefundene Gefiltin (Glasgow et al., 1992; Asch et al., 1998; Markl und Schechter, 1998) bzw. das in der *Xenopus*-Retina detektierte Xefiltin (Zhao und Szaro, 1997), das neuronale *Xenopus*-IF-Protein XNIF (Charnas et al., 1992) sowie die α -Internexine gehören ebenfalls zu den IF-Proteinen vom Typ IV.

Die im Zellkern auftretenden Lamine bilden den fünften Typ. Sie unterscheiden sich jedoch durch sechs zusätzliche Heptaden (42 Aminosäuren) im 1B-Coil der zentralen Rod-Domäne von den cytoplasmatisch exprimierten Proteinen der Typen I-IV und VI. Der sechste Typ der IF-Proteine beinhaltet das in neuronalen Stammzellen vorkommende Nestin (Lendahl et al., 1990; Steinert et al., 1999b). Zudem wird die Zugehörigkeit von Synemin, Paranemin, Tannabin und Syncoilin zu dieser Gruppe diskutiert (Hemmati - Brivanlon et al., 1992; Becker et al., 1995; Hemken et al., 1997; Bilak et al., 1998; Newey et al., 2001). Teilweise werden die Typ VI-Proteine nicht als eigenständiger IF-Protein-Typ angesehen (Steinert und Roop, 1988; Fuchs und Weber, 1994; Klymkowsky, 1995) bzw. den Typ IV-IF-Proteinen zugeordnet (Herrmann und Aebi, 2000).

Eine Reihe von weiteren Proteinen, die mehr oder weniger große Sequenzhomologien mit den IF-Proteinen aufweisen, lassen sich nicht eindeutig in die sechs Typen klassifizieren (Parry und Steinert, 1999). Eine Besonderheit bilden die keratinartigen $K\alpha$ - und $K\gamma$ -Proteine des Pazifischen Schleimaals *Eptatretus stouti* als Komponenten des extracorporalen Schleims (Koch et al., 1994; 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich in erster Linie mit Keratinen, Vimentin und Desmin befasst.

2.1 Keratine

Mit einer großen Diversität und Komplexität repräsentieren Keratine den Typ I und Typ II der IF-Proteine. Neben den meist in Epithelien exprimierten Cytokeratinen existieren auch noch die haar- und nägelbildenden trichocytären Keratine (Heid et al., 1988a; Heid et al., 1988b; Langbein et al., 1999). Keratinfilamente entstehen *in vivo* obligat aus Typ I/Typ II-Heterodimeren (Hatzfeld und Franke, 1985; Coulombe und Fuchs, 1990; Steinert, 1990; Hatzfeld und Weber, 1990a). Je nach Vorkommen in den Geweben existieren *in vivo* jedoch nur bestimmte „Expressionspaare“, obschon *in vitro* Keratine mit jedem Vertreter des komplementären Typs Filamente bilden können (Hatzfeld et al., 1987). Die meisten Typ II-Keratine der Tetrapoden sind größer als Typ I-Keratine und ihr isoelektrischer Punkt ist basischer als die entsprechenden Werte bei den Typ I-Keratinen (Moll et al., 1982; Eichner et al., 1984; Hoffmann et al., 1985). Bei Fischen treffen diese Attribute allerdings nicht zu (Markl et al., 1989; Conrad et al., 1998; Schaffeld et al., 1998).

Die epithelialen Keratine der bis heute untersuchten Wirbeltiere können aufgrund ihrer gewebe-spezifischen Expression weiter unterteilt werden: so kommen in einschichtigen Epithelien wie bspw. Darmmukosa, Nierentubuli oder Hepatocyten in der Regel die sogenannten „S“-Keratine (von „simple epithelial“), in mehrschichtigen Epithelien wie der Epidermis die „E“-Keratine (von „epidermal“) zur Expression (Markl et al., 1989; Markl und Schechter, 1998; Schaffeld et al., 1998). Durch die übergeordnete Trennung in Typ I und Typ II existieren demnach vier Subtypen der Cytokeratine (**I_E**, **I_S**, **II_E**, **II_S**), von denen in jedem untersuchten Organismus ein oder mehrere Vertreter zur Expression kommen. Während der Ontogenese von Säugern und Amphibien bildet das heterologe Paar der „S“-Keratine K8 und K18 die ersten Intermediärfilamente (Franz und Franke, 1986; Bader et al., 1988; Fouquet, 1991). Orthologe Keratine dieses Expressionspaares kommen in allen bisher untersuchten gnathostomen Wirbeltieren (Kiefernfüßern) vor. Die Gene, die für diese beiden Proteine codieren,

liegen beim Menschen direkt benachbart auf Chromosom 12 (Schaffeld et al., 2001a; Hesse et al., 2001).

Mindestestens 14 verschiedene Krankheiten werden beim Mensch direkt durch den funktionellen Ausfall von Keratinen ausgelöst, meist hervorgerufen durch Mutationen in den hochkonservierten Anfangs- und Endregionen der helikalen Rod-Domäne (Coil 1A und 2B). Durch den Zusammenbruch des dreidimensionalen Cytoskeletts verlieren die Zellen ihre Form und Reißfestigkeit und das gesamte epitheliale Gewebe kann durch eingeschränkte Zell-Zell-Interaktionen betroffen sein (McLean und Lane, 1995; Korge und Krieg, 1996; Fuchs und Cleveland, 1998; Irvine und McLean, 1999).

2.2 Die Typ III Proteine Desmin und Vimentin

Neben ihrer Sequenz unterscheiden sich die Typ III-IF-Proteine von den Keratinen vor allem dadurch, dass sie *in vivo* meist Homopolymere ausbilden. Heterofilamente mit anderen Typ III-IF-Proteinen wurden jedoch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet. Mit allen Vertretern der Typ IV-IF-Proteinen und sogar mit dem Typ VI-Protein Nestin wurden darüberhinaus *in vitro* Heterodimerisierung nachgewiesen (Steinert et al., 1981; Quinlan und Franke, 1982; Traub et al., 1993; Rogers et al., 1996; Steinert et al., 1999a; Steinert et al., 1999b). Kopolymerisation mit Keratinen kann aber ausgeschlossen werden (Stewart, 1993; Cary und Klymkowsky, 1994).

Exprimiert wird Desmin in gnathostomen Wirbeltieren in allen Typen von Muskelgewebe (Lazarides et al., 1982; Herrmann et al., 1989b; Loh et al., 2000; Schaffeld et al., 2001b), während Vimentin typischerweise bei Landwirbeltieren und Knorpelfischen in den meisten mesenchymalen Zelltypen die Filamentnetzwerke ausbildet (Franke et al., 1978; Moll und Franke, 1982; Herrmann et al., 1989a; Schaffeld et al., 2001b). Bei Vertretern der Teleosteer wurde allerdings beobachtet, dass in mesenchymalen Zellen Keratine dominieren (Markl und Franke, 1988; Markl et al., 1989; Conrad et al., 1998) und dass Vimentin in weit weniger Zelltypen exprimiert wird (Herrmann et al., 1996b; Cerda et al., 1998).

Die Abwesenheit von Desmin verursacht (bei Mäusen) größere Schäden in Muskelzellen des Herzens und der glatten Muskulatur (Li et al., 1996), das Protein ist aber nicht essentiell für die Differenzierung und Fusion der Muskelzellen, sondern eher für deren Stabilität verantwortlich (Capetanaki et al., 1997; Li et al., 1997). Tiere, die durch induzierte Mutation kein Vimentin exprimieren, scheinen sich zwar normal zu entwickeln (Colucci Guyon et al., 1994), die Astrocyten, in denen normalerweise Vimentin und GFAP koexprimiert werden, bilden jedoch keine funktionalen GFAP-Netzwerke mehr (Galou et al., 1996). Bei Mäusen führt das Fehlen von Vimentin in Fibroblasten überdies zu einer Verzögerung der Wundheilung (Eckes et al., 2000).

Die primäre Aminosäureabfolge der bisher sequenzierten Typ III-IF-Proteine der Vertebraten zeigt einen hohen Konservierungsgrad, wobei selektive Mechanismen bei Desmin noch stärker zu wirken scheinen als bei Vimentin (Schaffeld et al., 2001b).

2.3 Die α - und γ -IF-Proteine des Pazifischen Schleimaals

Weitgehend beschränkt sich die Funktion der IF-Proteine auf intrazelluläre Aufgaben. Die einzige bekannte Ausnahme bilden besondere Intermediärfilament-Proteine des Schleimaals *Eptatretus stouti*, ein Vertreter der Cyclostomata (Rundmäuler). Die in speziellen holokrinen Drüsen-Faden-Zellen synthetisierten Proteine bilden sehr lange fadenförmige Filamente (bis 0,6 Meter, 3 μm breit), die unter Stress extrazellulär in den das Tier umgebenden Schleim abgegeben werden (Downing et al., 1984; Spitzer et al., 1984). Die Filamentfäden, die fast das gesamte Cytoplasma der Zelle ausfüllen können (Abb. 3), sind mitverantwortlich für die viskosen und kohäsiven Eigenschaften des Schleims und beeinflussen dessen Löslichkeit im umgebenden Meerwasser (Koch et al., 1991a). Sie können ferner zu noch stabileren „Kabeln“ (bis 40 cm lang, \O 50-800 μm) aggregieren, die u. a. an den Eigelegen des Schleimaals hängen (Koch et al., 1991b).

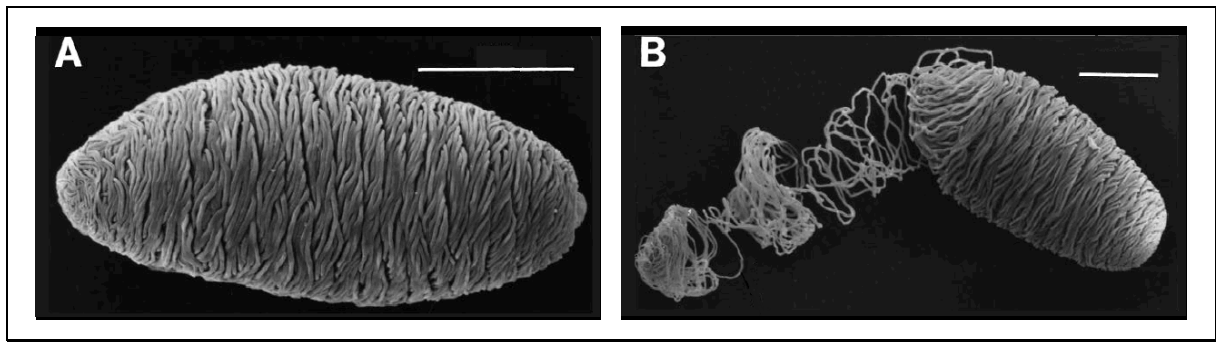


Abb. 3 Konformation des Filamentfadens in den Drüsen-Faden-Zellen des Pazifischen Schleimaals *Eptatretus stouti*. Die weiße Linie entspricht einer Länge von 50 μm . **A:** Raster-Elektronenmikroskop-Aufnahme einer Zelle ohne Plasmamembran. Der IF-Faden füllt das gesamte Cytoplasma aus. **B:** Teilweise entwickelter Filamentfaden. Aus Koch et al. (1994).

Die Filamentfäden des Schleimaals werden neben einer geringen Anzahl von Mikrotubuli von zwei IF-Monomeren geformt, die als α - und γ -IF-Proteine bezeichnet werden. In den Drüsen-Faden-Zellen tritt α immer in einem nahezu äquimolaren Verhältnis zu γ auf (Spitzer et al., 1988). Ein mögliches drittes Protein (β) hat zu γ so große biochemische und immunologische Ähnlichkeit, dass es als posttranslational modifizierte Isoform von γ beschrieben wurde (Koch et al., 1995).

Die beiden Proteine, die weitgehend die typische Grundstruktur der IF-Proteine aufweisen, lassen sich nicht ganz eindeutig den Keratinen zuordnen (Parry und Steinert, 1999), obschon sie vor allem aufgrund der obligaten Heterodimerisierung sowie Ähnlichkeiten in der Primärstruktur von Head- und Tail-Domäne zweifellos keratinartig sind. Das α -Protein ist eher Typ II-ähnlich, das γ -Protein entspricht Typ I (Koch et al., 1994; 1995). Gleichzeitig regen die Autoren jedoch an, dass im Falle der Entdeckung α - und γ -orthologer Proteine bei anderen Organismen über die Etablierung eines eigenen IF-Typs zu diskutieren (Koch et al., 1994; 1995).

3. Die Evolution der IF-Proteine

Die phylogenetisch ältesten bekannten Intermediärfilament-Proteine sind die in allen Eumetazoen vorkommenden Lamine (Erber et al., 1999). Die als Typ V zusammengefasste Gruppe unterscheidet sich von den anderen IF-Gruppen vor allem durch zusätzliche 42 Aminosäuren in der zentralen Rod-Domäne (Coil 1B).

Bis jetzt identifizierte cytoplasmatische IF-Proteine von Protostomiern aus unterschiedlichen Geweben weisen strukturelle Ähnlichkeit zu den Laminen auf, da sie ebenfalls an gleicher Position zusätzliche sechs Heptaden besitzen. Außerdem enthalten die meisten der IF-Proteine von Nematoden, Anneliden und Mollusken in der carboxyterminalen Domäne einen Lamin-homologen Abschnitt. Anscheinend haben sich die ersten cytoplasmatischen IF-Proteine aus Laminen entwickelt, bei denen das in der Tail-Domäne liegende Signal für die Zellkernlokalisierung mutierte (Loewinger und McKeon, 1988; Weber et al., 1988; Weber et al., 1989; Dodemont et al., 1990; Riemer et al., 1991; Szaro et al., 1991; Tomarev et al., 1993; Adjaye et al., 1995; Bovenschulte et al., 1995; Erber et al., 1999).

Es ist nicht bekannt, ob sich IF-Proteine mit einer kurzen 1B-Subdomäne schon mit dem Auftreten der Deuterostomier oder erst innerhalb der Chordatenevolution entwickelten, da von den biochemisch nachgewiesenen IF-Proteinen der Echinodermaten bis jetzt noch keine Sequenzinformationen vorliegen (St-Pierre et al., 1994; Holy, 2000).

Die Eigenschaften der IF-Proteine des Tunicaten *Styela* – ein Urochordat – deuten auf eine funktionelle und teilweise auch strukturelle Verwandtschaft mit den IF-Typen I-III der Wirbeltiere hin: zwei der vier Proteine bilden *in vitro* homopolymere Filamente, zudem besitzt eines davon ein konserviertes Aminosäuremotiv in der Head-Domäne, welches sich bei Typ III- und Typ IV-IF-Proteinen findet (Karabinos et al., 1999). Diese Sequenz ist essentiell für die Assemblierung der Typ III-Proteine (Herrmann, 1995; Herrmann et al., 1996a). Die beiden anderen formen heteropolymere Filamente miteinander. Eines davon koassembliert auch mit dem Typ II-Keratin K8 des Krallenfroschs *Xenopus* und verhält sich demnach wie ein Typ I-Keratin. (Riemer und Weber, 1998; Wang et al., 2000). Die Charakterisierung von fünf der 13 identifizierten Intermediärfilament-Proteinen des Cephalochordaten *Branchiostoma* als Keratine beruht ebenso in erster Linie auf ihrer Fähigkeit, Heterodimere untereinander oder mit menschlichen Keratinen bilden zu können (Riemer et al., 1992; Karabinos et al., 1998; Riemer et al., 1998; Karabinos et al., 1999).

Die Typisierung der IF-Proteine von *Styela* und *Branchiostoma* basiert demnach eher auf funktionellen Kriterien als auf Sequenzhomologien. Die Aminosäureabfolge dieser Proteine sowie ihre Genstruktur unterscheiden sich von den Vertebraten-Keratinen sowie von Desmin so sehr, dass ihre Zugehörigkeit zu den Typen I, II und III in Sequenz-Alignments nicht zu erkennen ist (Parry und Steinert, 1999).

Eindeutig anhand ihrer Primärstruktur zuzuordnen sind die IF-Proteine des jeweiligen Typs erst innerhalb der gnathostomen Wirbeltiere. Die Chondrichthyes (Knorpelfische), die sich schon früh in der Entwicklung der Gnathostomata von den Knochenfischen trennten, besitzen wie der Mensch vier

cytoplasmatische Keratin-Subtypen (IE, IS, IIE, IIS) sowie Vimentin und Desmin. Die gewebetypische Expression dieser Proteine entspricht weitgehend der Situation terrestrischer Vertebraten (Schaffeld et al., 1998; 2001b).

Bei den Teleostern (moderne Knochenfische) sind vor allem die Keratine bei Forelle und Zebrafisch gut erforscht (Markl und Franke, 1988; Markl et al., 1989; Markl, 1991; Conrad et al., 1998). Die Expression der Keratine beschränkt sich hier allerdings wie erwähnt nicht allein auf Epithelien; besonders in mesenchymalen Zellen übernehmen sie die Rolle des Vimentins, welches in weitaus weniger Zelltypen exprimiert wird. Da dieses breitgefächerte mesenchymale Auftreten der Keratine weder bei altertümlichen Knochenfischen wie Stör und Flösselhecht noch in anderen Wirbeltierklassen beobachtet wurde, scheint es ein apomorphes Merkmal der Teleosteer darzustellen (Schaffeld et al., 2001a).

4. Ziel der Arbeit

Die Erforschung der IF-Proteine innerhalb der Agnathen (Kieferlose) kann dazu beitragen, die Evolution der Typen I bis IV besser zu verstehen, da sie zwischen den bekannten Intermediärfilament-Proteinen deuterostomer Invertebraten wie *Styela* und *Branchiostoma* und den etablierten IF-Typen der gnathostomen Vertebraten von Hai bis Mensch vermitteln.

Die einzigen bekannten IF-Proteinsequenzen von Agnathen waren zu Beginn meiner Arbeit neben einer Neurofilament-Proteinsequenz des Meeresneunauges *Petromyzon marinus* (Jacobs et al., 1995), die oben beschriebenen keratinartigen α - und γ -IF-Proteine des Schleimaals. Während von Typ III-IF-Proteinen von Agnathen keinerlei Daten vorlagen, existierte von den Keratinen des Flussneunauges *Lampetra fluviatilis* ein Expressions-Katalog, der auf der Basis einer biochemischen und immunfluoreszenzmikroskopisch orientierten Diplomarbeit aufgestellt worden war (Brauer, 1993; Markl und Schechter, 1998). Keratine wurden mit ähnlichen Methoden bei *Petromyzon* auch in den Larven (*Ammocoetes*), der Leber, den Hornzähnen des Saugmundes und in Gliazellen nachgewiesen (Alarcon und Filosa, 1994; Merrick et al., 1995; Zaccone et al., 1995; Alarcon et al., 1997).

Die vorliegende Arbeit sollte durch Sequenzanalysen klären, ob die Agnathen als ursprünglichste Vertebratenklasse bezüglich ihrer Keratine eher die Verhältnisse der niederen oder der gnathostomen Chordaten repräsentieren. Darüber hinaus sollten Typ III-IF-Proteine gesucht und sequenziert werden. Weitere Fragestellungen ergaben sich durch die Entdeckung der vom Schleimaal bekannten α - und γ -IF-Proteine.

Letztendlich interessierte auch die Frage, ob und wie gut sich die IF-Proteinsequenzen des Neunauges als Außengruppe für molekulare Stammbäume der Gnathostomier-IF-Proteine eignen.

B Material und Methoden

1. Versuchstiere

1.1 Systematische Stellung von *Lampetra fluviatilis*

Neunaugen verdanken ihren Namen der unpaaren Nasenöffnung, dem jeweiligen Auge und den sieben runden Kiemenspalten, die sich auf jeder Körperseite in einer ca. 12 cm langen geraden Linie in caudaler Richtung anordnen (Abb. 4).

Das Flussneunauge *Lampetra fluviatilis* gehört neben anderen Neunaugen wie dem Meerneunauge *L. marinus* und dem Bachneunauge *L. planerie* zu der Ordnung der Petromyzontoidae. Zusammen mit den Myxinoidea (Schleimaale) bilden sie die Klasse der Cyclostomata (Rundmäuler). Die beiden Ordnungen sind seit dem Oberkarbon getrennt. Die Überklasse Agnatha, deren Hauptmerkmal das namensgebende Fehlen des Kiefers ist, beinhaltet neben den Cyclostomata auch die seit dem Devon ausgestorbene Klasse der Ostracodermi (Schalenhäuter). Agnathen trennten sich früh von der Entwicklung der übrigen Vertebraten und werden als die ertümlichsten Vertreter dieser Gruppe angesehen. Sie hatten vor allem im Palaeozoikum ihre größte Radiation.

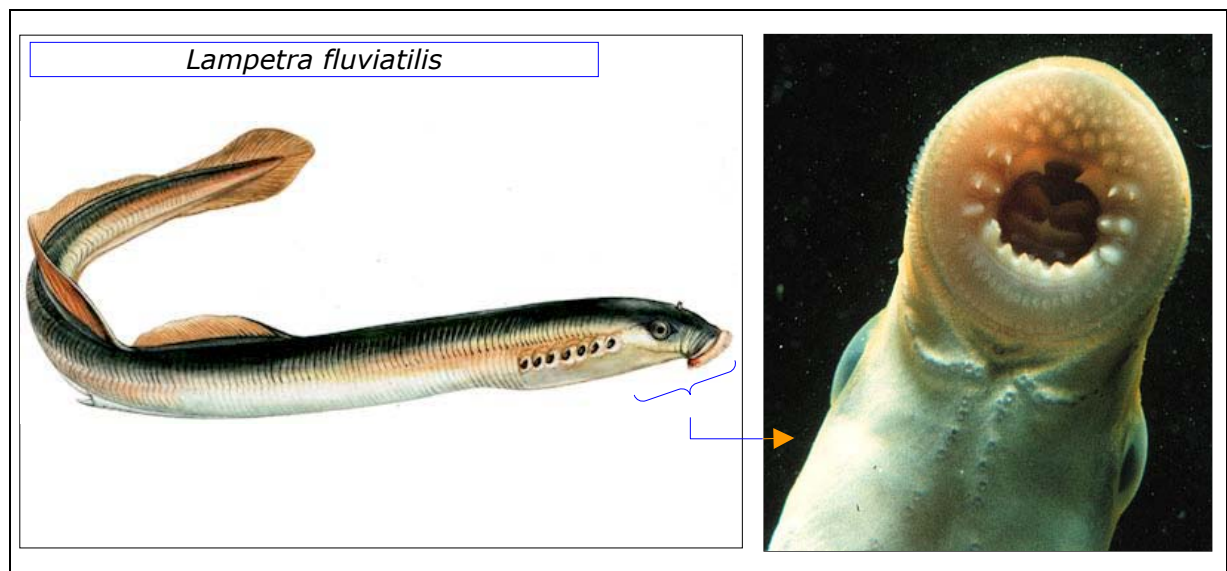


Abb. 4 Das Flussneunauge *Lampetra fluviatilis*. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die ventrale Seite des Kopfes fotografiert: zu sehen sind dort lateral die Augen und der kreisrunde, mit den Hornzähnen besetzte Saugmund.

1.2 Lebensweise von *Lampetra fluviatilis*

Das Flussneunauge führt – ähnlich Lachsen – eine anadrome und monotelische Laichwanderung durch, d.h. die Tiere ziehen zum Laichen vom Meer flussaufwärts (anadrom). Die Nahrungsaufnahme wird in dieser Phase eingestellt, der Verdauungstrakt atrophiert, so dass die Tiere nach dem Ablachen nicht mehr lebensfähig sind und absterben (Monotelie). Das Weibchen legt 4000 bis 40 000 Eier auf den Untergrund von größeren Flüssen. Die als *Ammocoetes branchialis* bezeichneten Larven sind hemisessile Strudler, die nach mehreren Jahren metamorphieren und dann ins Meer wandern. Das Flussneunauge lebt räuberisch, indem es sich mit seinem Saugmund an einem Wirt – meist größeren Fischen – festsaugt, mit Hornzähnen die Haut aufraut und sich von Blut und Gewebe des Wirttieres ernährt.

1.3 Herkunft, Hälterung und Töten der Tiere

Die fünf verwendeten Neunaugen, drei adulte weibliche und zwei adulte männliche Tiere, stammen aus der Elbe (Stromkilometer 602) von der Fischzucht „Wilhelm Grube“ aus Stelle bei Hamburg, wo sie als Beifang in den Aalreusen gefangen wurden (siehe Anhang F10).

Gehältert wurden sie für maximal drei Monate in 4°C - 8°C kaltem Süßwasser ohne Nahrungszufuhr.

Die Tiere wurden mit 400 mg/Liter MS222 (3-Aminobenzoesäure-ethylester-methansulfonsäure; Serva, Heidelberg) in Süßwasser narkotisiert und anschließend durch Dekapitieren getötet.

1.4 Präparation der Flussneunaugen

Die Tiere wurden direkt nach dem Töten präpariert. Dabei wurden alle Organe getrennt entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und separat bei -78°C eingefroren. Gewebe, die für die Immunfluoreszenzmikroskopie vorgesehen waren, wurden in vorgekühltem Isopentan bei -78°C eingefroren. Ein Teil der entnommenen Organe wurde direkt zur RNA-Gewinnung in entsprechendem Puffer aufgenommen und direkt weiterbearbeitet (siehe B8).

2. Chemikalien

Die Standardchemikalien wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Kalsruhe), Sigma (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) in Analysequalität bezogen. Die verwendeten Elektrophoresekammern, Nassblotkammern und Netzgeräte waren Produkte der Firma Biotec Fischer (Reiskirchen). Sofern nicht abweichend beschrieben, erfolgten bei kleinen Mengen alle Zentrifugationen bei 20800g und 4°C in einer Mikroliter-Tischzentrifuge (Centrifuge 5417 R; Eppendorf, Hamburg), bei größeren Volumina in einer Tischzentrifuge (Haereus, Fulda). Photometer waren ein „BioPhotometer“ der Firma Eppendorf (Hamburg) sowie ein Ultraspec[®] Plus-Photometer (Pharmacia, Freiburg). Auf weitere verwendete Chemikalien und Geräte wird an entsprechenden Stellen im Text hingewiesen.

3. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen und Arbeitsbedingungen

Für alle molekularbiologischen und mikrobiologischen Arbeiten wurden autoklavierte (1 bar Überdruck, 121°C, 30 min) Geräte und autoklaviertes, bidestilliertes Wasser (H_2O_{bidest}) verwendet. RNA-Arbeiten wurden zudem immer zusätzlich mit DEPC-behandeltem H_2O_{bidest} (Diethylpyrocarbonat), gestopften Pipettenspitzen und Latex-Handschuhen durchgeführt, um eine Kontamination der Proben mit RNasen zu vermeiden. Lösungen mit genomischer DNA wurden mit weiten bzw. abgeschnittenen Pipetten und ohne Vortexen behandelt, um Scherkräfte zu vermeiden. Für PCR-Techniken wurden Pipetten mit kleinen Maximalvolumina verwendet. Bei Arbeiten mit DNA- oder RNA-Gelelektrophoresen wurden statt Latexhandschuhen Handschuhe aus Nitril (AQL-Wert <1,5) verwendet, die für das kanzerogene Ethidiumbromid weniger durchlässig sein sollen.

4. Antikörper

Der monoklonale Antikörper **IFA** (Pruss et al., 1981) markiert ein Epitop, das in ähnlicher Form in allen IF-Proteinen konserviert ist. Die übrigen verwendeten Antikörper finden sich in Tab. 1 und 2.

Antikörper gegen Keratine:

Tab. 1: Verwendete polyklonale (pk) Meerschweinchen-Antikörper, die bei anderen Organismen spezifisch Cytokeratine (CK) erkennen.

Antikörper	Typ	Antigen	Quelle	Kurzzitat
GPT4	pk	CK der Forelle	J. Markl, Uni Mainz	(Markl und Franke, 1988)
GPT5	pk	CK der Forelle	J. Markl, Uni Mainz	(Markl und Franke, 1988)

Antikörper gegen Typ III-IF-Proteine:

Tab. 2: Verwendete monoklonale (mk) und polyklonale (pK) Antikörper, die bei anderen Organismen spezifisch Vimentin oder Desmin erkennen.

Antikörper	Typ	Antigen	Quelle	Kurzzitat
13.2	mk / IgM	Hühner-Vimentin	Sigma Deisenhofen	--
H5	mk / IgG1	Hühner-Vimentin	DSHB	(Herman et al., 1993)
XV2	pK	<i>Xenopus</i> -Vimentin	H. Herrmann	(Schaffeld et al., 2001b)
Anti-Desmin	pK	Hühner-Desmin	Sigma (Deisenhofen)	--
D33	mk / IgG 1	humanes Desmin	DAKO, Hamburg	(Van Muijen et al., 1987)
DE-B-5	mk / IgG 1	humanes Desmin	Boehringer, Mannheim	(Debus et al., 1983)
<i>Xenopus</i> 1	pK	<i>Xenopus</i> -Desmin	H. Herrmann	--
<i>Xenopus</i> 2	pK	<i>Xenopus</i> -Desmin	H. Herrmann	--
<i>Xenopus</i> 3	pK	<i>Xenopus</i> -Desmin	H. Herrmann	--
<i>Xenopus</i> 4	pK	<i>Xenopus</i> -Desmin	H. Herrmann	--

5. Allgemeine molekularbiologische Methoden

5.1 Nukleinsäurepräzipitation

Nukleinsäuren bilden in Anwesenheit von niedrigen Konzentrationen einwertiger Kationen ein Präzipitat, das durch Zentrifugation gewonnen werden kann.

Die entsprechenden Proben wurden mit 2,5 Volumina Ethanol bzw. 0,7 Volumen Isopropanol und einer Lösung von einwertigen Kationen (Konzentrationen: siehe Tab. 3) gemischt und 30 Minuten bei -70°C bzw. über Nacht bei -20°C präzipitiert. Dann wurden die Ansätze bei 20 000 g für 30 Minuten bzw. bei 6000 g für eine Stunde zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und in geeignetem Puffer bzw. $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen.

Tab. 3 Kationenkonzentrationen für die Nukleinsäurepräzipitation

Salzlösung	Stammlösung (M)	Endkonzentration (M)
Ammoniumacetat	10,0	2,0 bis 2,5
Lithiumchlorid	4,0	0,4
Natriumchlorid	2,0	0,2
Natriumacetat	3,0	0,3

5.2 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Während der Isolierung von DNA bzw. RNA ist es möglich, Verunreinigungen durch Proteine oder einzelne Nukleotide mittels Phenol/Chloroform-Extraktion zu beseitigen. Die zu reinigende Nukleinsäureprobe wurde hierzu mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) (Verhältnis 25:24:1) für 20 Sekunden gemischt (Vortexen) und zur Phasentrennung für 2 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase mit den darin enthaltenen Nukleinsäuren wurde in ein frisches Gefäß überführt und zwei weitere Male nach demselben Schema mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) extrahiert. Durch diese Schritte wurde das verbliebene Phenol aus der wässrigen Lösung entfernt. Für Phenol/Chloroform-Extraktionen, die RNA extrahieren sollten, wurde kristallines Phenol unter leichtem Erwärmen (max. 50°C) gelöst und mit einer geringen Menge ($<10\%$ v/v) des jeweilig benutzten Puffers ausgeschüttelt.

5.3 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Um eine DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung abzuschätzen, wurde je $1\ \mu\text{l}$ der zu bestimmenden Probe und eine Reihe (je $1\ \mu\text{l}$) eines Standards bekannter Konzentrationen auf eine mit $1,0\%$ Agarose (in TBE-Puffer, versetzt mit $0,01\%$ Ethidiumbromid; vgl. B 5.6) befüllte Petrischale getropft und nach zehnmütiger Inkubationszeit im UV-Durchlicht ausgewertet (UV-Transilluminatoren der Wellenlängen $366\ \text{nm}$ und $254\ \text{nm}$, Bachofer, Reutlingen).

Die genaue Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung kann photometrisch anhand ihrer Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen werden. Die optische Dichte (OD_{260}) mit einem Wert von 1 entspricht für dsDNA 50 µg/ml, für ssDNA bzw. RNA 40 µg/ml und für Oligonukleotide 20 µg/ml. Bei Messungen von RNA-Konzentrationen wurde grundsätzlich mit verdünnten Proben aus der Stammlösung gearbeitet, um Kontaminierungen zu vermeiden.

Der Quotient aus den ermittelten Extinktionen bei 260 nm sowie 280 nm gibt zusätzlich Aufschluss über den Reinheitsgrad der zu messenden Nukleinsäure. Wenn bei einer zu messenden Probe dieser Wert weit außerhalb des Bereichs zwischen 1,8 und 2,0 lag, wurde ein weiterer Reinigungsschritt dieser Nukleinsäurelösung durchgeführt.

5.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus 2 ml einer Übernachtskultur gewonnen. Basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979), anschließender Präzipitation der bakteriellen Proteine und DNA sowie Aufreinigung über eine Silicagel-Membran-Säule wurde die Plasmidpräparation gemäß Herstellerangabe durchgeführt.

QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden)

E.Z.N.A. HP Plasmid Mini Kit I der Firma Peqlab (Erlangen)

Die Ausbeute an reiner Plasmid-DNA betrug bei beiden Kits etwa 10 µg; diese wurden in 50 µl H_2O_{bidest} eluiert, entsprechend einer Plasmid-DNA-Konzentration von 200 ng/µl. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde bei $-20^{\circ}C$ gelagert.

5.5 Restriktionsverdau von dsDNA

Restriktionsendonukleasen des Typ II spalten dsDNA nur in bestimmten palindromischen Sequenzabschnitten, die meist 4 bis 8 Basenpaare umfassen. Die Spaltung kann entweder zu glatten doppelsträngigen (blunt-end) oder zu versetzten, partiell einsträngigen Enden führen.

Verwendet wurden Restriktionsendonukleasen der Firma Stratagene (Heidelberg). Die Puffer und deren Konzentrationen wurden für die verschiedenen Restriktionsenzyme nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Standard-Restriktionsansatz zum Verdau von Plasmid-DNA (20 µl)

- 3 µl DNA-Lösung (entsprechend ca. 600 ng in H_2O_{bidest})
- 2-4 µl 10× Reaktions-Puffer (entsprechend Herstellerangabe)
- je 1 µl Restriktionsenzym (2,5 U/µl)
- 10-14 µl steriles bidest. Wasser

Der Restriktionsverdau erfolgte für 1,5 bis 2 Stunden bei der für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Temperatur (meist $37^{\circ}C$) im Wärmeschrank und wurde durch Erhitzen für 10 Minuten bei $65^{\circ}C$ (Wasserbad) abgestoppt, sofern das Ergebnis nicht direkt durch anschließende Gelelektrophorese überprüft wurde.

5.6 Gelelektrophorese

- **DNA-Gelelektrophorese:**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte, je nach erwarteten Fragmentgrößen in 0,5- bis 1,5%-igen horizontalen Agarosegelen, versetzt mit 0,01% Ethidiumbromid. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierendes, interkalierendes Molekül, welches sich zwischen die Basenpaarstapel der DNA einlagert und so das Molekül im UV-Durchlicht sichtbar macht (UV-Transilluminatoren der Wellenlängen 366 nm und 254 nm, Bachofer, Reutlingen).

An die Gelkammer wurde eine konstante Spannung von 8V pro Zentimeter Elektrodenabstand angelegt, der Elektrophoresepuffer war 1× TBE. Die zu trennenden Proben wurden mit Beladungspuffer vermischt, als Molekulargewichtsstandard wurde λ -Phagen-DNA (restringiert mit EcoR I und Hind III) aufgetragen. Die Gele konnten nach dem Lauf mit einem „Video-Copy-Processor“ (Mitsubishi) fotografiert werden.

10 × TBE	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 20 mM EDTA	pH 8,3
10 × Beladungspuffer	50% Glycerin 0,4% Bromphenolblau 0,4% Xylencyanol	
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml	

- **RNA-Gelelektrophorese:**

Im Gegensatz zur DNA-Gelelektrophorese muss man bei der RNA-Gelelektrophorese beachten, dass potentiell eine Gefahr durch RNA-spaltende RNasen ausgehen kann und das RNA Sekundärstrukturen ausbilden kann, die das Laufverhalten im Gel verändern. Im Gel und im Laufpuffer war deswegen Formaldehyd (FA) enthalten, das verwendete Wasser war frei von RNasen (DEPC-H₂O_{bidest}) und die RNA wurde vor dem Beladen für 5 Minuten auf 70°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Zusätzlich wurde die Gelkammer vor Benutzung eine halbe Stunde lang mit dem Laufpuffer äquilibriert.

10 × FA Gel Puffer	0,2 M MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA	(3-(N-Morpholino))-2-Hydroxypropansulfonsäure- Natriumsalz pH 7,0
1 × FA Gel-Puffer	100 ml 10 × FA Gel Puffer 20 ml 37% (12.3M) Formaldehyd 880 ml RNase-freies H ₂ O _{bidest}	
1,2% FA Gel	1,2 g Agarose 10 ml 10 × FA Gel Puffer RNase-freies H ₂ O _{bidest} auf 100 ml 1,8 ml 37% (12.3M) Formaldehyd	Zugabe nach dem Schmelzen der Agarose und Abkühlen auf 65°C aus Stammlösung
5 × RNA Beladungspuffer	16 µl Bromphenolblau 80 µl 500 mM EDTA 720 µl 37% (12.3M) Formaldehyd 2 ml 100% Glycerin 3084 µl Formamid 4 ml 10×FA Gel Puffer RNase-freies H ₂ O _{bidest} auf 10 ml	pH 8,0
Ethidiumbromid- Stammlösung	10 mg/ml	

5.7 Blotten von Nukleinsäuren

Nach Gelelektrophoresen war es möglich, die im Agarosegel aufgetrennten Nukleinsäurefragmente durch Blotverfahren auf Nylonmembranen (Fa. Boehringer, Mannheim) zu übertragen. Die so behandelten Membranen konnten dann mit markierten DNA-Sonden hybridisiert und so Nukleinsäurefragmente mit spezifischen Sequenzmotiven im Gel indirekt nachgewiesen werden. Handelte es sich um Gele mit DNA wurde der Southernblot durchgeführt, nach RNA-Gelelektrophoresen der Northernblot. Der Aufbau eines Southernblot/Northernblot ist in Abb. 5 dargestellt.

• Southernblot

Um das Gel zu blotten, wurde es in Denaturierungslösung gelegt, anschließend neutralisiert und in 2 × SSC äquilibriert. Die Gele wurden über Nacht geblottet und die DNA durch Inkubation bei 80°C für 30 Minuten auf der Nylonmembran fixiert. Der Transferpuffer war 20 × SSC. Die Zusammensetzung der Lösungen, die Hybridisierung und Detektion ist in Abschnitt B 10.2 erläutert.

- **Northernblot**

Bevor die RNA-Gele geblottet werden konnten, mussten sie in $2 \times \text{SSC}$ äquilibriert werden, um das im Gel enthaltene Formaldehyd zu entfernen. Die Gele wurden anschließend über Nacht geblottet. Da die RNA durch die Bedingungen des Formaldehydgels bereits denaturiert war, konnte sie direkt nach dem Transfer bei 80°C immobilisiert werden. Die Hybridisierung und Detektion erfolgte wie in Abschnitt B 10.2 beschrieben.

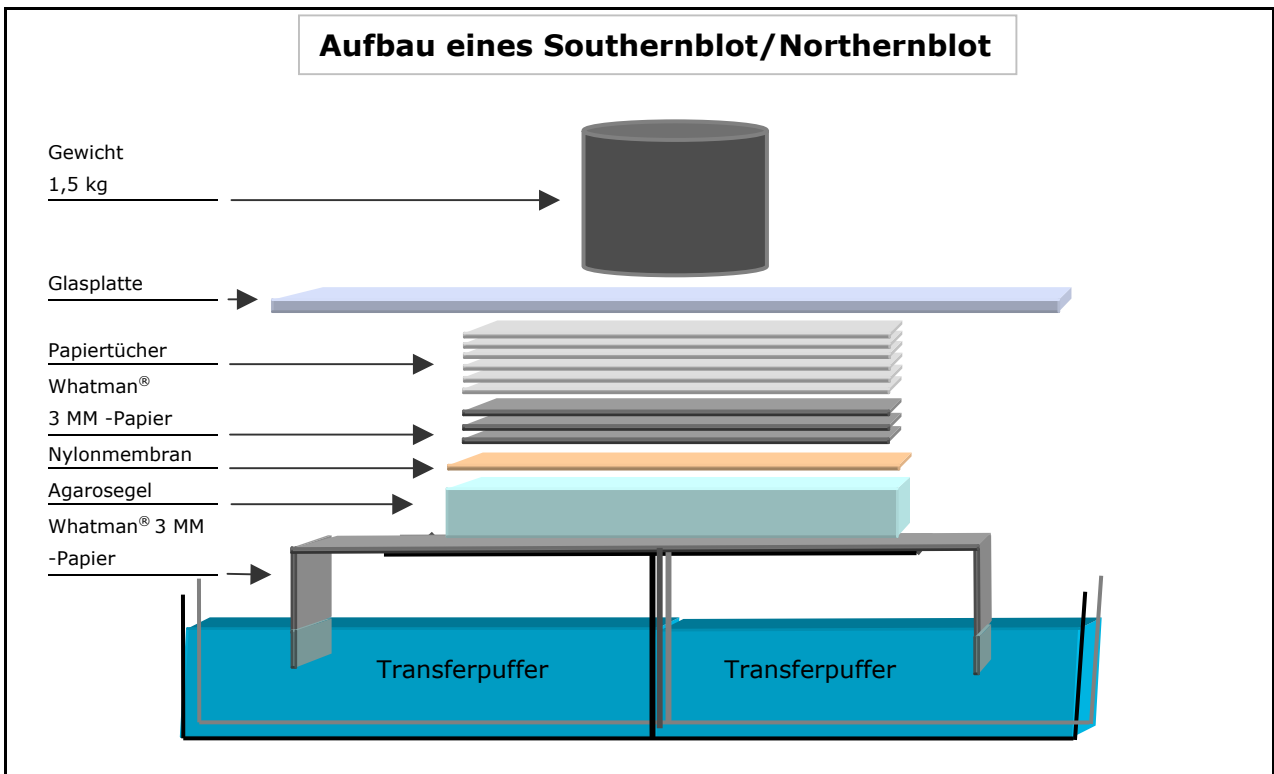


Abb. 5 Aufbau eines Southernblot/Northernblot. Das zu blottende Gel wird auf ein Whatman® 3 MM Papier gelegt, das in den Transferpuffer hineinreicht. Auf dem Gel wird die Nylonmembran platziert und darüber folgen einige Schichten Whatmanpapier sowie ein Stapel einfacher Papiertücher. Zum Beschweren wird eine Glasplatte mit einem Gewicht aufgelegt. Der Transferpuffer ($20 \times \text{SSC}$) wird durch Kapillarkräfte aus dem Reservoir durch das Gel und die Membran in die Papiertücher gezogen und transportiert dabei die DNA/RNA aus dem Gel auf die Membran.

5.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

DNA aus Gelelektrophoresen wurde mit Hilfe des „Qiagen Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) extrahiert. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen beruht auf der selektiven Bindung von DNA an eine Matrix aus Silicagel unter hohen Salzkonzentrationen bei pH-Werten unterhalb von pH 7,5. Im leicht alkalischen Milieu bei pH-Werten größer pH 8 bzw. niedrigeren Salzkonzentrationen lassen sich die gebundenen DNA-Stücke nach Aufreinigung dann wieder ablösen (mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder 10 mM Tris/HCl, pH 8,5).

5.9 Markierung von DNA

DNA-Fragmente wurden markiert, um sie bspw. im Rahmen eines Screenings oder im Blot selektiv nachzuweisen. Als Marker wurde Digoxigenin (DIG) verwendet. Digoxigenin ist ein Hapten, das als Marker an ein dNTP, meist dUTP, angeheftet wird. Digoxigenin wird aus den Blättern der Digitalis-Pflanze gewonnen. Dort kommt es ausschließlich als Lanatosid-Verbindung vor. Es hat den Vorteil, dass es nicht radioaktiv ist und gleichzeitig in ausreichend geringem Abstand in ein DNA-Molekül eingebaut werden kann (siehe Abb. 6).

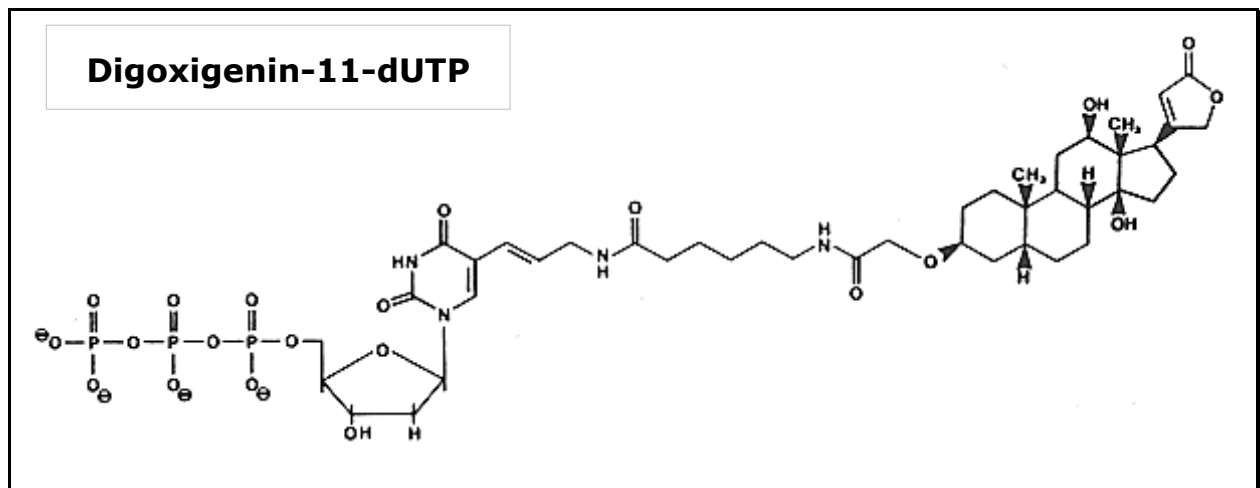


Abb. 6 Strukturformel des Digoxigenin (DIG-11-dUTP).

Es wurden zwei verschiedene Methoden der Digoxigeninmarkierung durchgeführt. Nach der jeweiligen Markierungsreaktion wurden die Ansätze mit Lithiumchlorid/Ethanol präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert. Anschließend wurde die Ausbeute der Reaktion im Vergleich zu einer Standardlösung mit bekannter Dig-Markierung überprüft.

- **Digoxigeninmarkierung mit Klenow-Enzym (Feinberg und Vogelstein, 1983; 1984)**

Diese Methode fand Einsatz bei DNA-Fragmenten, die größer als 300 Basenpaare waren und unmarkiert in ausreichender Menge vorlagen. Das Prinzip dieser Markierungsmethode beruht auf der Anlagerung von hexameren random-Oligonukleotiden an die denaturierten DNA-Fragmente. Diese Oligonukleotide dienen dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I als Primer zur Synthese des komplementären Strangs. Das verwendete Nukleotidgemisch enthält neben den vier Nukleosidtriphosphaten dGTP, dATP, dCTP (jeweils 1 mM) und dTTP (0,65 mM) das mit Digoxigenin modifizierte Nukleosidtriphosphat DIG-11-dUTP (0,35 mM). Verwendet wurde das „Dig-High Prime“-System der Fa. Boehringer (Mannheim).

- **Digoxigeninmarkierung mittels PCR**

Bei wenig Ausgangsmaterial, bei DNA-Fragmenten mit einer Gesamtlänge unter 300 Basenpaaren oder wenn eine Sequenz vorlag, die nicht durch Restriktionsverdau gewonnen werden konnte, wurde die Digoxigeninmarkierung mit Hilfe der PCR durchgeführt (siehe B 12.3). DIG-11-dUTP lag hierbei im Gemisch der Nukleotide im Verhältnis 1:20 vor („PCR-Dig-Labeling-Mix“, Boehringer, Mannheim). Abweichend von den Herstellerangaben wurden statt 10 µl „PCR-Dig-Labeling-Mix“ für eine Markierungsreaktion nur 1-2 µl verwendet, was sich als völlig ausreichend für eine gute Digoxigeninmarkierung erwies. Die verwendeten Primer für die Synthese waren nicht markiert. Der Erfolg der Digoxigeninmarkierung mittels PCR ließ sich im Agarosegel durch ein sichtbar langsames Laufverhalten der amplifizierten und markierten DNA-Bande gegenüber einer Vergleichs-PCR ohne DIG-11-dUTP direkt kontrollieren.

6. *Allgemeine mikrobiologische Methoden*

6.1 **Bakterien, Phagen und Plasmid-Vektoren**

- **Bakterien**

E. coli XL1-blue MRF⁷ (Stratagene, Heidelberg)

E. coli XLOLR (Stratagene, Heidelberg)

E. coli BM25.8 (Clontech, Heidelberg)

E. coli Top 10 (Invitrogen, Karlsruhe)

- **Phagen und Plasmid-Vektoren**

λZAP Express Vektor (Stratagene, Heidelberg)

Ex AssistTM Helper Phage (Stratagene, Heidelberg)

λTriplEx2 (Clontech, Heidelberg)

pTriplEx2 (Clontech, Heidelberg)

pBK-CMV (Stratagene, Heidelberg)

pGEM-T Easy (Promega, Mannheim)

pGEM-T (Promega, Mannheim)

pCR[®] 2.1 TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe)

pCR[®] 4 TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe)

6.2 Nährmedien und Agarplatten

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

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

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

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

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

6.3 Glycerinkultur

Um Bakterien eines Klons über Monate stabil zu halten, wurden sie bei -78°C in einer Glycerinkultur gelagert. Dazu wurde 1 ml einer Übernachtskultur der betreffenden Bakterien mit derselben Menge einer 50% (w/v) Glycerinlösung versetzt und aliquotiert.

6.4 Bakterienkultur

• Plattenkultur

Auf eine Petrischale mit entsprechendem Agarmedium, welches mit geeignetem Antibiotikum versetzt worden war, wurden Bakterien aus einer Glycerinkultur, Flüssigkultur oder von einer anderen Platte mit einer ausgeglühten Platinöse ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Platten waren für mehrere Wochen bei 4°C haltbar.

• Flüssigkultur

Um eine Flüssigkultur eines Bakterienklons herzustellen, wurde die entsprechende Einzelkolonie mit Hilfe einer ausgeglühten Platinöse oder einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte in 5 – 50 ml des geeigneten Kulturmediums überführt und bei 37°C schüttelnd (200 rpm) über Nacht inkubiert. Wurden Bakterien für die Plaquefilterhybridisierung kultiviert (vgl. B10), waren dem Medium vorher MgSO_4 (Endkonzentration 10 mM) und Maltose (Endkonzentration 0,2%; w/v) zugesetzt worden. Zur Konzentrationsbestimmung von Flüssigkulturen wurden über Nacht gewachsene Bakterienkulturen 15 Minuten bei 1000g zentrifugiert und das sedimentierte Pellet anschließend mit 10 mM MgSO_4 resuspendiert. Die optische Dichte (OD_{600}) wurde anschließend in einem Spektrophotometer (Ultraspec[®] Plus; Pharmacia, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen bzw. auf den gewünschten Wert eingestellt. Als Referenz diente 10 mM MgSO_4 oder LB-Medium (siehe Tab. 4).

Tab. 4 Einstellungsgrößen der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) im Spektrophotometer nach Flüssigkultivierung verschiedener *E. coli*-Stämme und die jeweilige Verwendung der Bakterien.

<i>E. coli</i> -Stamm	OD_{600} in 10 mM MgSO_4	Verwendung
XL1-blue MRF'	0,5	Plaquefilterhybridisierung
XL1-blue MRF'	1,0	<i>in-vivo</i> -Excision
XL1-blue MRF'	0,2 – 0,4 in LB-Medium	Kompetente Zellen
XL0LR	1,0	<i>in-vivo</i> -Excision
BM25.8	> 1,0	<i>in-vivo</i> -Konversion
Top 10	Fertigprodukt	Kompetente Zellen

6.5 Kompetente Bakterien

Um Plasmide zu klonieren, wurden sie in kompetente Bakterien transformiert. Die Bakterien wurden nach einer modifizierten CaCl_2 -Methode (Cohen et al., 1972) kompetent gemacht. Dazu wurden Bakterien einer Flüssigkultur im Verhältnis 1 : 100 in frischem Medium bei 37°C (200 rpm) inkubiert,

bis sie eine OD_{600} von 0,2 – 0,4 erreicht hatten. Die sich nun in der exponentiellen Wachstumsphase befindenden Bakterien wurden pelletiert (10 Minuten bei 5000g, 4°C, Sorvall Kühlzentrifuge RC5B, Rotor: SS34), in 20 ml vorgekühltem $MgCl_2$ (0°C – 4°C, 0,1 M) aufgenommen, erneut sedimentiert und anschließend in 2 ml kaltem $CaCl_2$ (0,1 M) resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden dann für mindestens 30 Minuten ruhig auf Eis stehen gelassen und konnten anschließend für die Transformation verwendet werden.

6.6 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation von Plasmiden in kompetente Zellen wurden 100 μ l Bakteriensuspension aus 0 oder 50 μ l *E. coli* Top 10 (Fertigprodukt) von Invitrogen (Karlsruhe) mit den zu transformierenden Plasmiden (etwa 10 bis 100 ng zirkuläre Plasmid-DNA) gemischt und für mindestens 20 Minuten auf Eis gehalten. Nach kurzem Hitzeschock (maximal 50 Sekunden bei exakt 42°C) wurde dem Ansatz 900 μ l LB-Medium (250 μ l SOC-Medium bei *E. coli* Top10) zugesetzt und die Bakterien bei 37°C (150-200 rpm) für 90 Minuten inkubiert. Danach wurden 100 μ l des Ansatzes auf LB-Platten ausplattiert, die mit geeigneten Antibiotika zur Selektion rekombinanter Klone versetzt waren.

7. *Präparation von genomischer DNA*

Die Gewinnung von genomischer DNA aus Gewebe wurde mit dem DNA-Extraction-Kit der Firma Stratagene (Heidelberg) vorgenommen. Nach einer mechanischen Homogenisierung von 500 mg Gewebe erfolgte ein Verdau der zellulären Proteine mit Proteinasen (2 Stunden, 55°C). Anschließend wurden die Zelltrümmer gefällt und abzentrifugiert. RNA, die wie die genomische DNA im Überstand verbleibt, wurde durch Zugabe von RNase verdaut (15 Minuten, 37°C).

Die DNA ließ sich dann durch Zugabe von zwei Volumina Ethanol präzipitieren und das dabei durch vorsichtiges Invertieren entstehende DNA-Knäuel („hair ball“) mit einem Glasstab aufwickeln. Nach Reinigung (70% Ethanol) konnte die DNA in TE-Puffer durch behutsames Schütteln resuspendiert werden. Von der DNA-Lösung wurde die Konzentration photometrisch bestimmt.

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

8. *Präparation von RNA*

8.1 Gesamt-RNA-Präparation

Das Flussneunauge *Lampetra fluviatilis* erwies sich als schwieriges Objekt bezüglich der Gesamt-RNA-Präparation. Kommerzielle Kits lieferten wiederholt keine RNA. Die Phenol-Chloroform-Methode produzierte die höchsten Ausbeuten, konnte jedoch die RNA nicht ohne DNA-Verunreinigungen isolieren (siehe Abb. 7). Die Lithiumchlorid-Harnstoff-Fällung lieferte die reinste RNA jedoch relativ geringe Absolutmengen. Deshalb wurden Organe hierfür isoliert behandelt und die gewonnene RNA anschließend für die mRNA-Isolierung wieder zusammengeführt.

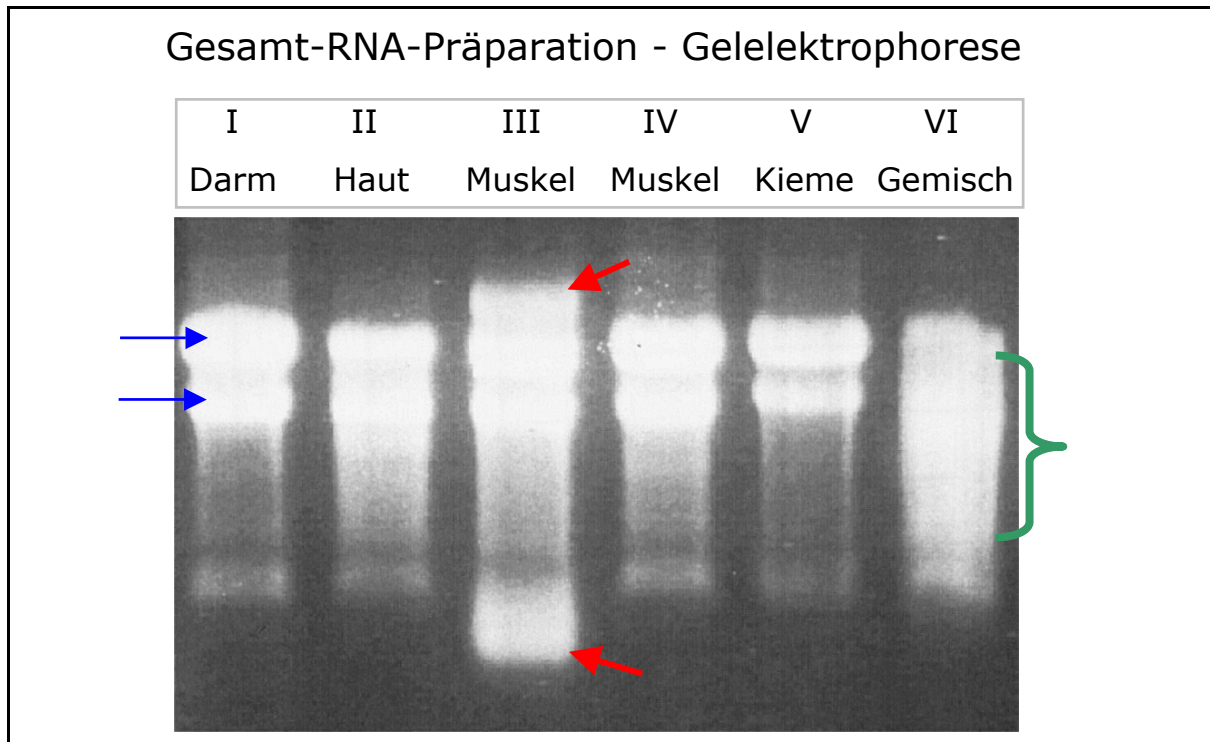


Abb. 7 RNA-Gelelektrophorese. Gesamtpräparation nach der LiCl-Harnstoff Methode (Spur I, II, IV, V und VI) bzw. nach der Phenol-Chloroformmethode (Spur III). Gut sind die beiden ribosomalen RNA-Banden (rRNA) erkennbar (blaue Pfeile). Die Ursprungsgewebe sind über der jeweiligen Spur angegeben. Spur VI beinhaltet ein RNA-Gemisch aus Ösophagus, Hirn, Saugmund, Chorda und Auge. Dort ist die RNA teilweise degradiert (grüne geschweifte Klammer). In Spur III kann man Verunreinigungen durch hochmolekulare DNA und kleine Nukleinsäurefragmente erkennen (rote Pfeile). Foto: UV-Transilluminator, 254 nm; Video-Copy-Processor (Mitsubishi); vgl. B 5.6.

- **Phenol-Chloroform-Methode nach Scheller, 1977**

Eine Mischung aus verschiedenen Geweben (Haut, Muskel, Darm, Kieme, Saugmund, Hirn, Auge) von *Lampetra fluviatilis* (2g), sowie separate Organe (Muskel, Kieme; je 1g) wurden in sterilen 50 ml-Polypropylengefäßen (Falcon, Greiner) mit einem Ultra-Turax der Firma Jahnke & Kunkel (Staufen im Breisgau) in 20 ml TEN-Puffer gründlich zerkleinert und homogenisiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Phenol-(pH 4)-Chloroform-Isoamylalkohol-Puffer (mit TEN Puffer ausgeschüttelt; PCI-Puffer, vgl. B 5.2) unter Schütteln bei 4°C für 10 Minuten und anschließender Zentrifugation (30 Minuten, 6000g). Die wässrige Phase wurde in ein frisches Gefäß überführt und erneut mit 1 Volumen PCI-Puffer extrahiert und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar und somit frei von Proteinen war. Dann erfolgten zwei Extraktionen mit Chloroform/Isoamylalkohol (mit TEN Puffer ausgeschüttelt, vgl. B 5.2). Der die RNA enthaltende Überstand wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 2 M NaCl und 0,7 Volumen Isopropanol (absolut) bei -20°C über Nacht gefällt, in RNase-freiem H₂O_{bidest} aufgenommen und weiter aufgereinigt (siehe unten).

TEN-Puffer 50 mM Tris/HCl pH 7,6
10 mM EDTA
0,1 M NaCl
1% Lauroylsarcosinat → autoklavieren
200 µg/ml Heparin

• Lithiumchlorid-Harnstoff-RNA-Präparation

Der große Vorteil dieser Methode ist, dass genomische DNA nur wenig durch eine hochmolare Lithiumchloridlösung präzipitiert wird (Barlow et al., 1963; Cathala et al., 1983).

Die RNA wurde teilweise aus verschiedenen Organen separat isoliert; eingesetzt wurden Gewebeproben aus Darm (ca. 1g), Kieme, Muskel und Haut (je ca. 2g) sowie ein weiterer Ansatz, der aus einer Mischung von Ösophagus, Hirn, Saugmund, Chorda und Auge bestand (insgesamt ca. 3g).

Das zu bearbeitende Gewebe wurde in einem Polypropylengefäß (50 ml) mit kaltem LiCl-Urea-Puffer (Homogenisierungspuffer) bedeckt und gründlich mit dem Ultra-Turax homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend über Nacht auf Eis stehen gelassen und dann für 30 Minuten bei 3000g zentrifugiert. Das dabei entstehende Pellet konnte nun wieder mit Homogenisierungspuffer resuspendiert werden und ein weiteres Mal zentrifugiert werden. Nach Aufnahme des Sediments in TE-SDS folgten zwei Phenol-(pH 4)-/Chloroform-Extraktionen, wobei die nach der Zentrifugation gebildete Interphase erst bei der Reinigung mit Chloroform/Isoamylalkohol verworfen wurde. Die wässrige Phase wurde bis zu einer Endkonzentration von 2 M mit Lithiumchlorid versetzt und wiederum über Nacht auf Eis inkubiert. Es folgten eine Zentrifugation bei 3000g für 30 Minuten, die Aufnahme des Niederschlags in 3 ml TE-Puffer, sowie eine weitere Präzipitation mit Ammoniumacetat und Ethanol über Nacht bei -20°C. Die RNA wurde schließlich bei 6000g für 1 Stunde pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und nach der Trocknung bei RT je nach Pelletgröße in 0,5 ml bzw. 1 ml RNase-freiem H₂O_{bidest} resuspendiert. Zur Kontrolle wurde nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt, um die Reinheit der RNA zu überprüfen (siehe Abb. 7).

LiCl-Stammlösung 6 M Lithiumchlorid → autoklavieren

LiCl-Urea-Puffer 3 M Lithiumchlorid
6 M Harnstoff

TE-SDS 10 mM Tris/HCL pH 7,5
1 mM EDTA
1% SDS
→ autoklavieren

8.2 Aufreinigen der Gesamt-RNA

Der RNeasy Maxiprep Kit der Firma Qiagen GmbH (Hilden), der u.a. für die Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben vorgesehen ist, lieferte beim Neunauge keine RNA. Dennoch ließ sich das Prinzip der Bindung von RNA an eine Silicagel-Matrix zumindest für die Aufreinigung von RNA nach der Phenol/Chloroform-Methode verwenden. Die RNA wurde auf die Säule gegeben, mehrmals mit Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert und schließlich mit RNase-freiem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eluiert. Die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

8.3 Messenger-RNA-Isolierung

Für die Isolierung von messenger-RNA (mRNA) wurden die „PolyAtract[®]-mRNA-isolation“ Systeme I und IV der Fa. Promega (Mannheim) verwendet und ohne Modifikationen laut Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip der Methode beruht auf der Kopplung von Oligo(dT)-Oligonukleotiden mit Biotin am 5'-Ende. Nach der Anlagerung dieser Oligonukleotide an den Poly-A⁺-Schwanz der mRNA-Moleküle („Annealing“) wurden Streptavidin-gekoppelte Magnetpartikel (Streptavidin-PMP, **p**aramagnetic **p**articles) zugegeben. Biotin bindet an Streptavidin, und in einem magnetischen Feld konnten so die PMP-Streptavidin-Biotin-mRNA-Komplexe vom Rest der Suspension abgetrennt werden. Durch das Erniedrigen der Salzkonzentration löste sich diese Bindung, und die Poly-A⁺-RNA konnte in RNase-freiem Wasser eluiert werden.

9. cDNA-Banken

Komplementäre DNA-Bibliotheken (cDNA/cDNA-Bank) repräsentieren die Information, die in den messenger-RNAs eines bestimmten Gewebes oder Organismus enthalten ist. Aufgrund der Instabilität von mRNA ist es notwendig, die Information in eine beständigere DNA-Form zu konvertieren und diese in selbst-replizierende λ -Vektoren zu insertieren. Die cDNA-Bibliothek bildet dann die Grundlage für weitere analytische Schritte.

Zur cDNA-Synthese wurden der ZAP-Express[®] Synthese-Kit von Stratagene und der SMART[™] cDNA Synthese-Kit von Clontech (beide Heidelberg) verwendet.

Bei beiden Methoden entstehen cDNA-Expressionsbanken, in die cDNA gerichtet in die Vektorarme kloniert werden kann. Über den Induktor IPTG wird die Expression des in der cDNA codierten Proteins induziert. Neben der Möglichkeit mit spezifischen Nukleinsäure-Sonden die cDNA-Bank zu durchsuchen, besteht also auch die Option, mit Hilfe gegen das Zielprotein gerichteter Antikörper, die exprimierten Proteine zu detektieren. Des Weiteren bieten beide Systeme einen einfachen Weg, cDNA-Sequenzen aus den rekombinanten λ -Phagen in wenigen Schritten in ein Plasmid zu überführen (siehe B11). Die Unterschiede in der Herstellung doppelsträngiger cDNA bei beiden Systemen sowie der gesamte schematische Ablauf ist in Abb. 8 dargestellt.

Es wurden insgesamt drei cDNA-Banken nach dem ZAP-Express[®]-System (Z I, Z II, Z III) und eine nach dem SMART[™] (S I) hergestellt.

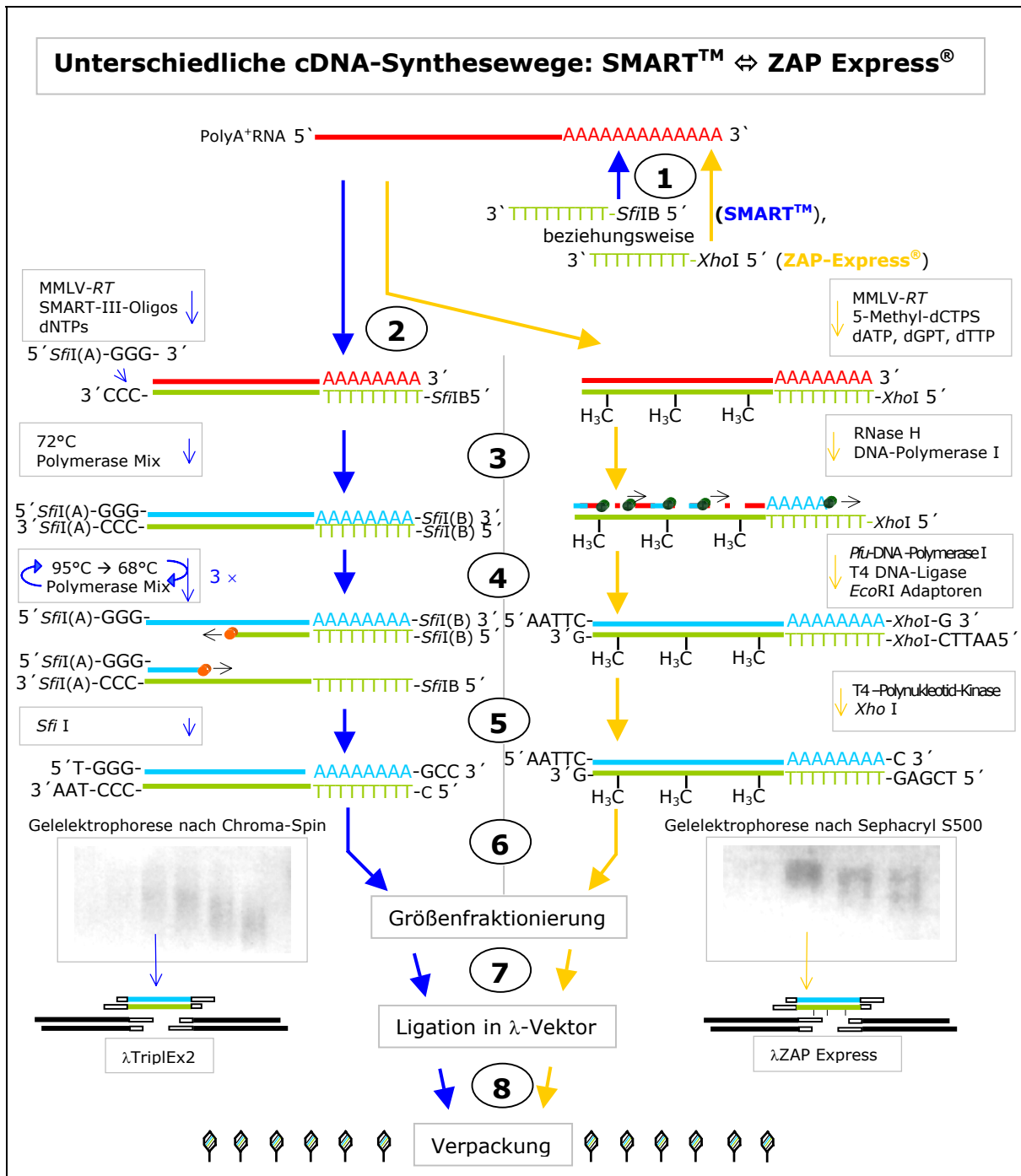
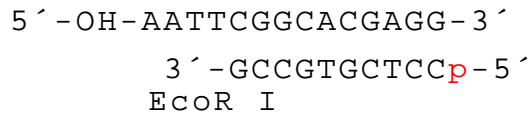


Abb. 8 Unterschiede in der ds-cDNA-Synthese bei den Kits ZAP Express (rechte Spalte) und SMART™ (linke Spalte). **1:** mRNA und komplementärer Primer für das jeweilige System am Poly-A-Schwanz. **Linke Spalte (SMART™):** **2:** Erststrangsynthese und Binden des Zweitstrang-Primers. **3:** Auffüllen des Zweitstrangs. **4:** „Primer Extension“ in drei Zyklen. **5:** Verdau mit *Sfi* I-Restriktionsenzym an *Sfi* I-Erkennungsstellen A und B. **Rechte Spalte (ZAP Express):** **2:** Erststrangsynthese mit 5-Methyl-dCTPS. **3:** RNase H-Verdau und Zweitstrangsynthese, ausgehend von RNA-Resten. **4:** Blunting der verbliebenen Lücken im Zweitstrang und Ligation der EcoR I-Adaptoren auf beiden Seiten der cDNA. **5:** Phosphorylierung der EcoR I-Enden und Verdau mit Xho I Restriktionsenzym. **Beide Wege:** **6:** Größenfraktionierung mittels Säulenmatrix. **7:** Ligation der gewählten Fraktion in die jeweiligen Vektorarme. **8:** Verpackung in λ-Phagen.



Am anderen Ende ist der EcoR I-Adapter am 9-mer phosphoryliert (P) und kann deswegen, unter Zuhilfenahme einer Ligase an die geraden Enden der cDNA gebunden werden. Das trockene cDNA-Pellet wurde mit der Adaptorslösung resuspendiert und eine halbe Stunde bei 4°C stehen gelassen. Die Ligation erfolgte dann nach Zugabe der übrigen Komponenten bei 8°C über Nacht.

- **Phosphorylierung der EcoR I – Enden und Restriktionsverdau mit Xho I**

Das Ende des EcoR I Adapters, das die EcoR I Schnittstelle trägt, ist nicht phosphoryliert, um zu verhindern, dass sich während der Ligation je zwei EcoR I – kohäsive Enden verbinden.

Nach der Hitzeinaktivierung der Ligase (30 Minuten; 70°C) wurde das 13-mer Ende phosphoryliert, um die Ligation in die dephosphorylierten Vektorarme zu ermöglichen. Im Anschluss wurde dann die Kinase durch Hitze inaktiviert (30 Minuten; 70°C).

Durch den darauf folgenden Verdau mit Xho I wurde am 3'-Ende der cDNA eine, für die Ligation in die Vektorarme benötigte Xho I Schnittstelle bereitgestellt. Die cDNA selbst konnte aufgrund ihrer Hemimethylierung durch diesen Schritt nicht restringiert werden. Der Verdau erfolgte bei 37°C für 90 Minuten.

- **Größenfraktionierung der cDNA**

Bei der Transkription der mRNA in cDNA entstehen je nach mRNA-Länge verschieden große cDNA-Sequenzen. In der Regel interessieren jedoch für die weitere analytische Behandlung nur bestimmte Sequenzlängen. Vorbereitend wurde eine Säule mit Sephacryl S500 befüllt und mit STE-Puffer gewaschen und äquilibriert. Die cDNA wurde dann auf diese Matrix aufgebracht und bei 400 g unter weiterer Zugabe von STE-Puffer wiederholt zentrifugiert. Große Moleküle wandern bei der Zentrifugation schneller durch die Sephacryl-Säule als kleinere und die durch den Xho I - Verdau abgetrennten EcoR I-Adapter des 3'-Endes werden vom Rest der längeren cDNA abgetrennt.

Auf diese Weise konnten mehrere Fraktionen erstellt werden, die in einem Agarosegel hinsichtlich ihrer Größe und absoluten Menge untersucht wurden. Die Fraktion, deren cDNA im gesuchten Größenbereich lag (ca. 1 kb-4 kb), wurde für die weitere Verwendung Phenol/Chloroform-extrahiert, mit Natriumacetat präzipitiert und in so viel H₂O_{bidest} aufgenommen, dass eine Konzentration von ca. 100 ng/μl vorlag.

- **Ligation der cDNA in ZAP Express™ Vektorarme**

Wie laut Herstellerangaben gefordert, wurden für Ligation 100 ng cDNA und 1 μg ZAP Express™ Vektor eingesetzt. Die Ligation, katalysiert von der T4-DNA-Ligase, erfolgte über zwei Tage bei 4°C. Im Anschluss an die Ligation wurde die Verpackung der cDNA und der Vektorarme in λ-Phagen durchgeführt (siehe B 9.3).

- **Proteinase K- und Sfi I-Verdau**

Der Proteinase K-Verdau ist notwendig, um die Polymerasen zu inaktivieren. Direkt im Anschluss wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt, um die Proteine aus der Lösung zu entfernen. Das Enzym Sfi I restringiert dann die cDNA-Moleküle auf beiden Seiten in unterschiedlichen Erkennungsstellen (A + B, siehe Primersequenzen), so dass die Fragmente später gerichtet in den Vektor ligiert werden können.

- **Größenfraktionierung mit CHROMA Spin-400 und Ligation in λ Triplex2 Vektor**

Die Größenfraktionierung der cDNA wurde, wie vorgeschrieben, mit einer CHROMA Spin 400 Tropfsäule durchgeführt. Die Säule wurde auf RT äquilibriert und der Lagerungspuffer durch Austropfen entfernt. Dann wurde die cDNA mit Xylencyanol als Farbmarkierung versetzt und von oben aufgetragen. Nach dem Einwandern der cDNA-Lösung in die Säulenmatrix wurde Säulenpuffer dazugegeben und sofort begonnen, die an der unteren Seite der Säule austretenden Tropfen zu sammeln. Dabei wurden 16 Fraktionen in je ein 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgenommen. Ein Zehntel jeder Fraktion wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und so die Größe und Menge der enthaltenen cDNA bestimmt. Die Fraktion, die cDNA in der gewünschten Größe enthielt, wurde vor der Ligation in den λ Triplex2 Vektor mit Natriumacetat gefällt und in 3 μ l H_2O_{bidest} aufgenommen. Von dieser Menge wurden 1,5 μ l entnommen und für die Ligation eingesetzt. Ligierte wurde über Nacht bei 16°C. Eine empirische Ermittlung des idealen Verhältnisses von cDNA zu Vektormenge – wie vom Hersteller gefordert - wurde nicht durchgeführt, da nur wenig cDNA zur Verfügung stand.

9.3 Verpackung und Bestimmung des Primärtiters

Die Verpackung und alle weiteren Schritte der cDNA-Bank-Synthese sind für beide beschriebenen Methoden identisch. Für die Verpackung der cDNA wurde der „Gigapack® III Gold Packaging Extract-Kit“ von Stratagene (Heidelberg) verwendet.

Die benötigte Menge an Verpackungssets wurde auf Trockeneis bereitgehalten. Direkt nach dem schnellen Auftauen des Verpackungssets wurde jeweils die Hälfte des Ligationsansatzes zum Verpackungsextrakt hinzugegeben und vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasenbildung gemischt. Nach kurzer Zentrifugation (3-5 Sekunden) wurde für exakt zwei Stunden bei 22°C inkubiert und dann durch Zugabe von 500 μ l SM-Puffer die Verpackungsreaktion abgestoppt. Mit zusätzlichen 20 μ l Chloroform wurde der Ansatz anschließend bei 3000 g für zwei Minuten zentrifugiert, um Trümmer abzutrennen.

Der die nun fertigen Bakteriophagen enthaltende Überstand – die cDNA-Primärbank – wurde bei 4°C gelagert und mit Hilfe einer Verdünnungsreihe der Titer der Primärbank bestimmt. Dazu wurden drei Verdünnungen (10⁰ μ l, 10⁻² μ l und 10⁻⁴ μ l in SM-Puffer) der Primärbank zusammen mit 600 μ l *E. coli* XL1-Blue MRF' bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend zusammen mit 8 ml flüssigem NZY-Top-Agarose (48°C) auf NZY-Petrischalen (\varnothing 132mm) ausplattiert. Nach 6 bis 8 Stunden bei

37°C waren die Phagenklone (pfu; **plaque forming units**) als Plaques im Bakterienrasen auf der Platte sichtbar und konnten ausgezählt werden.

SM-Puffer (pro Liter)	5,8 g NaCl	
	2,0 g MgSO ₄ × 7 H ₂ O	
	50,0 ml 1 M Tris/Cl,	pH 7,5
	5,0 ml 2% (w/v) Gelatine	→ autoklavieren

9.4 Amplifizierung der cDNA-Primärbank

Die primäre Ausbeute an Phagen ist in der Regel für eine nutzbare cDNA-Bank nicht ausreichend, so dass alle Phagen der Primärbank noch amplifiziert werden müssen.

Je 5×10^5 pfu wurden, wie oben beschrieben, zusammen mit den Wirtsbakterien auf eine große Petrischale ausplattiert. Die fast vollständig lysierten Platten wurden nach ca. 10-12 Stunden mit 10 ml SM-Puffer überschichtet und im Anschluss für mehrere Stunden bei 4°C sanft geschüttelt. Die dabei gebildete Bakteriophagensuspension wurde in ein steriles Polypropylengefäß überführt, mit 5% Chloroform versetzt und anschließend für zehn Minuten bei 500g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit 3% Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert. Von jeder fertigen cDNA-Bank wurde ein kleiner Teil mit DMSO (**Dimethylsulfoxid**) versetzt (Endkonzentration: 7%) und bei -78°C eingefroren. Von der fertig amplifizierten cDNA-Bank wurde mittels einer Verdünnungsreihe der Titer bestimmt.

10. Plauefilterhybridisierung („Screening“)

Für das Isolieren bestimmter Phagenklone aus den amplifizierten cDNA-Banken ist die Plauefilterhybridisierung eine adäquate Methode. Bei den vorliegenden cDNA-Banken war es einerseits möglich, mit Hilfe von Antikörpern die von der cDNA codierten und von den Wirtsbakterien exprimierten Proteine zu markieren. Andererseits konnte auch direkt mit markierten DNA-Sonden der Versuch unternommen werden, ein größeres Fragment derselben Sequenz oder Klone mit Sonden-ähnlicher Sequenz zu detektieren. Das Ausplattieren der cDNA Bank, d. h. die Infektion der Wirtsbakterien und die Bildung von Phagenplaques auf Agarplatten ist unter B 9.3 beschrieben. Für die erste Screening-Runde wurden maximal 5×10^5 pfu auf Agarplatten (Ø 132 mm) ausplattiert. Auf dem Bakterienrasen aufgelegte Filter wurden mit einer ausgeglühten Nadel mehrmals durchstoßen, um die Orientierung für die spätere Zuordnung zu markieren. Positiv identifizierte Phagenklone wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aus dem Agarboden ausgestochen, in 400 µl SM-Puffer und 10 µl Chloroform eluiert (Schütteln bei 4°C, mindestens 4 Stunden). Ausgehend von der entstandenen Phagensuspension wurden nach geeigneter Verdünnung frische Bakterien infiziert, auf neuen Agarplatten (Ø 82 mm) ausplattiert und wiederum der gesuchte Klon detektiert. Nach der zweiten oder dritten Vereinzlung war dann der positiv identifizierte Plaque für die weitere Verwendung (siehe B11) vollständig isoliert.

10.1 Antikörper-Screening

Die Expression der auf der cDNA codierten Proteine kann durch Zugabe eines β -Galaktosids induziert werden, da vor der Klonierungsstelle der *lacZ*-Promotor liegt. Es liegen allerdings nicht alle cDNA Klone im richtigen Leseraster vor, so dass statistisch nur jeder dritte Klon in der gewünschten Weise detektiert werden kann. Eine Ausnahme soll die cDNA-Bank von Clonotech darstellen, da hier theoretisch alle drei Leseraster transkribiert werden (vgl. B 9.2).

Das Antikörperscreening stellt eine Abwandlung der Immunoscreening-Methode nach Sambrook et al. (1989) dar. Nach dem Sichtbarwerden der ersten Phagenklone als Plaques im Bakterienrasen (nach ca. 5 h bei 37°C) wurden Nitrozellulosefilter (Macherey - Nagel, Düren) aufgelegt, die zuvor in 10 mM IPTG getränkt worden waren. IPTG fungierte hier als Induktor der Proteinexpression der in die Phagen klonierten Fremd-DNA. Durch weitere Inkubation der Platten bei 37°C für 6 bis 8 Stunden konnten die Fremdproteine auf die Nitrozellulosemembran transferiert werden.

Die Filter wurden von den Platten gezogen, zweimal für 5 Minuten in $1 \times$ TBST gewaschen und mit Magermilchpulver (10% w/v in TBST) für eine Stunde abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation der Filter mit dem gegen Intermediärfilament-Protein gerichteten Antikörpern unter sanftem Schütteln bei 4°C über Nacht. Die Antikörper waren dabei 1:4 bis 1:10000 in TBST verdünnt.

Die Filter wurden wieder in TBST gewaschen und mit einem sekundären anti-Ig-Antikörper inkubiert (2 h bei RT, schüttelnd). Diese anti-Ig-Antikörper lagen gekoppelt mit dem Enzym Alkalische Phosphatase vor und wurden in einer 1:7500-fachen Verdünnung eingesetzt. Die Detektion der Nitrozellulosefilter erfolgte nach erneutem Waschen mit TBST wie unter B16 beschrieben.

10 \times TBST 100 mM Tris/HCl pH 7,5
1,5 M NaCl
1% Tween 20

10.2 DNA-Sonden-Screening

Der Transfer der Phagenplaques erfolgte auf Nylonmembranen (Boehringer, Mannheim; Macherey - Nagel, Düren). Nach 1 bis 10 Minuten wurde der Filter wieder abgezogen und sofort mit der Plaque-Seite nach oben für zehn Minuten auf Whatman[®] 3 MM Papier gelegt, welches mit Denaturierungslösung getränkt war. Nach demselben Verfahren wurden die Filter dann anschließend neutralisiert (15 Minuten) und äquilibriert (10 Minuten).

Die getrockneten Membranen wurden anschließend 30 Minuten bei 80°C in einem Trockenschrank gebacken, um die Phagen-DNA fest an die Nylonmembran zu binden. Diese Membranen wurden direkt weiter verwendet oder bei RT trocken gelagert.

Die Hybridisierungstemperatur ist neben dem G/C-Gehalt und der Länge der erwarteten Hybride vor allem von der Ähnlichkeit der Sonde zur Zielsequenz abhängig. Bei vollständiger Identität von Sonde und gesuchter (längerer) Zielsequenz wurde bei 68°C hybridisiert, bei unspezifischem Screening

musste die optimale Hybridisierungstemperatur empirisch ermittelt werden. In der Regel lag sie dann zwischen 55°C und 60°C. Die Hybridisierungen erfolgten in Schüttelwasserbädern (Julabo, Seelbach) bzw. in einem Hybridisierungssofen (Saur, Reutlingen).

Die Nylonmembranen wurden zusammen mit ca. 100 ml Hybridisierungslösung eine Stunde bei der ermittelten Temperatur prähybridisiert, um alle freien Bindungsstellen der Nylonmembran abzusättigen.

Die DIG-markierte DNA-Sonde wurde mit 40 ml Hybridisierungslösung vermischt (Konzentration: 10 ng/ml) und zehn Minuten bei 95-100°C denaturiert. Sodann wurde die Prähybridisierungslösung entfernt und die mit der denaturierten Sonde versetzte Lösung sofort heiß zu den Membranen gegeben. Danach wurde über Nacht bei der ermittelten Temperatur hybridisiert.

Die Membranen wurden im Anschluss 2 × 5 Minuten in ausreichender Lösung aus 2 × SSC 0,1% SDS bei RT gewaschen; anschließend folgten zwei 15 minütige Inkubationen unter leichtem Schütteln in 0,5 × SSC 0,1% SDS bei Hybridisierungstemperatur.

Die Membranen wurden kurz in Waschpuffer äquilibriert und dann 30 Minuten in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend folgte eine 30-60 minütige Inkubation in Blockierungslösung, die mit anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmenten (Boehringer, Mannheim; 1:7500) versetzt wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Membranen detektiert (siehe hierzu B16).

Denaturierungslösung (pro Liter)	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl	
Neutralisierungslösung (pro Liter)	1,5 M NaCl 1,0 M Tris/HCl	pH 7,4
Äquilibrierungslösung (2 × SSC pro Liter)	0,3 M NaCl 0,03 M Natriumcitrat	pH: 7,0
Hybridisierungslösung (pro Liter)	5 × SSC 0,1% N-Laurylsarcosinat 0,02% SDS 1,00% Blocking-Reagenz	Boehringer, Mannheim
10 × Waschpuffer (pro Liter)	1,5 M NaCl 1 M Tris	pH: 7,5
Blockierungslösung	1 × Waschpuffer 1% Blocking-Reagenz	Boehringer, Mannheim

11. *In vivo-Excision und in vivo-Konversion*

Um die in die λ -Phagen klonierte Fremd-DNA aus dem Phagen genom in ein Plasmid zu überführen, bietet das ZAP Express™ cDNA Synthese-Kit die so genannte *in vivo-Excision*, der SMART™ cDNA Synthese-Kit von Clontech die *in vivo-Konversion* an. Für die jeweilige, nach Herstellerangaben durchgeführte Methode wurden von den im „Screening“ als positiv detektierten und anschließend vereinzelt Klonen 1×10^6 pfu eingesetzt.

11.1 *In vivo*-Excision

f1-Bakteriophagen-Proteine erkennen in den f1-Phagen normalerweise den Replikationsursprung („origin of replication“) für die +Strang-Synthese der genomischen DNA. Dieser Replikationsursprung wird unterteilt in eine Initiations- und eine Terminationsstelle. Bei dem für die Herstellung der cDNA-Bank verwendeten ZAP ExpressTM-Vektor (λ -Vektor) wurden Initiations- und Terminationsstelle separat inkloniert. Die sich dazwischen befindende Sequenz des Phagemids pBK-CMV, trägt eine Kanamycinresistenz und flankiert das gewünschte cDNA-Insert zwischen einer Xho I- und einer EcoR I-Schnittstelle.

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

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

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

11.2 *In vivo*-Konversion

Die Überführung des λ TriplEx2 Klon in ein zirkuläres pTriplEx2 Plasmid beim SMARTTM cDNA Synthese-Kit von Clontech ist das Ergebnis eines *Cre*-Rekombinase-vermittelten Rekombinationsereignisses. Dieses findet an den insertflankierenden *loxP*-Loci auf dem λ TriplEx2-Klon statt. Die *Cre*-Rekombinase wird in dem *E. coli* Stamm BM25.8 exprimiert und sobald die rekombinante Phagen-DNA in dieses Bakterium eingeschleust wird, erfolgt die Bildung des Plasmids. Das pTriplEx2 Plasmid trägt ein Ampizillinresistenzgen und so können plasmidhaltige BM25.8 auf dem entsprechenden Agar selektiert werden (siehe Abb. 9).

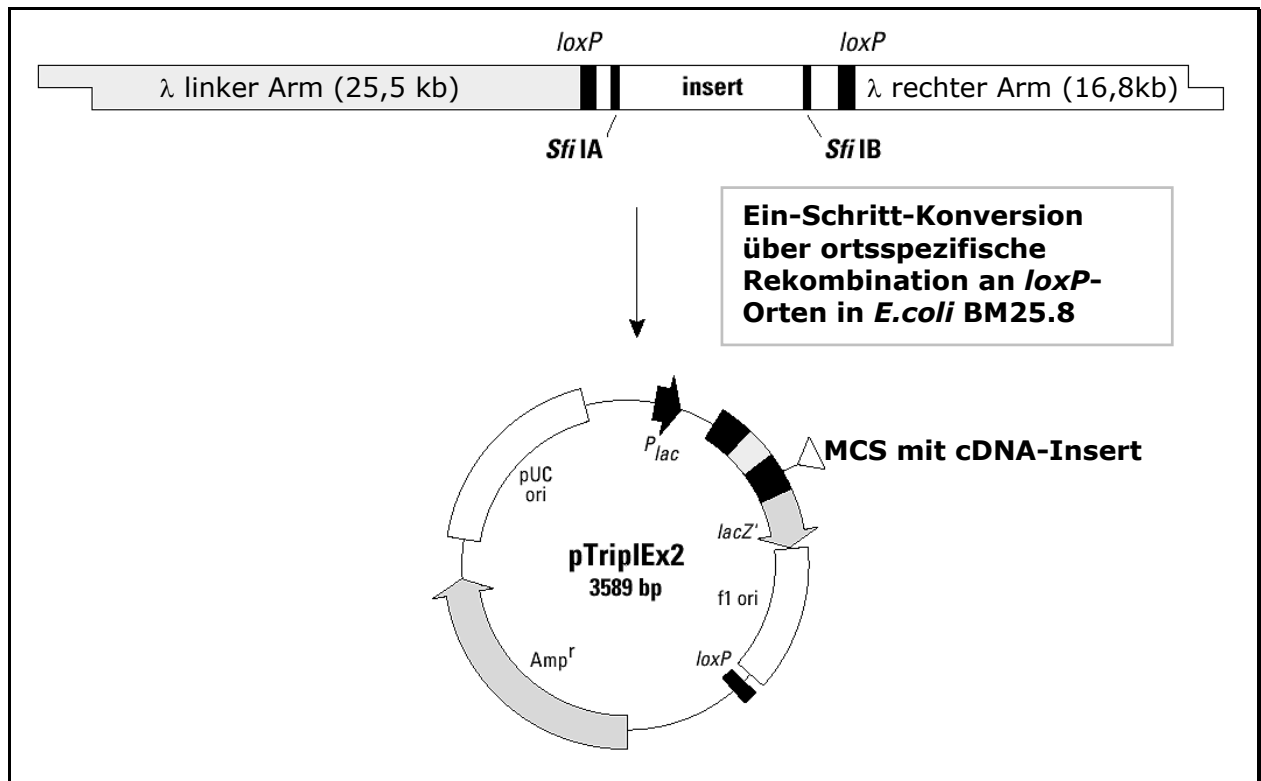


Abb. 9 *In vivo*-Konversion beim SMARTTM cDNA Synthese-Kit von Clontech. Nach der Infektion des rekombinanten Phagenklons in *E.coli* BM25.8 findet eine Rekombination an den insertflankierenden *loxP*-Loci auf dem λ TriplEx2-Phagengenom statt. Sie wird durch die in BM25.8 exprimierte *Cre*-Rekombinase vermittelt. Abbildung nach „SMARTTM cDNA Synthese-Kit user manual“.

12. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (**polymerase chain reaction**) amplifiziert exponentiell doppelsträngige DNA-Fragmente, die zwischen jeweils zwei, zumindest teilweise bekannten Sequenzabschnitten liegen. Dazu wird die DNA, die das zu vermehrende Stück (Zielsequenz) trägt, die sogenannte Template (oder auch Matrize) durch Erhitzen auf 94°C denaturiert, d. h. in die beiden komplementären Einzelstränge getrennt. An diese können dann jeweils ein Oligonukleotid (auch Primer; i. d. R. 18-30 Basenpaare) mit komplementärer Sequenz anlagern („annealen“). Dies geschieht bei der Schmelztemperatur des Primers. Vom 3'-Ende des Primers ausgehend kann im Anschluss eine DNA-Polymerase den jeweiligen DNA-Strang in 5'-3'-Richtung neu synthetisieren (Elongation). „Upstream“-Primer initiieren die Synthese eines „sense“-Strangs, „Downstream“-Primer einen „antisense“-Strang.

Daraufhin werden diese drei Schritte mehrfach wiederholt, wobei der Denaturierungsschritt kürzer als beim ersten Mal ist und sich die Menge der gebildeten DNA-Fragmente in jeder Wiederholungseinheit verdoppelt. Die Anzahl der synthetisierten Zielsequenz-DNA zwischen den beiden Primern nimmt dabei exponentiell zu, unter der Voraussetzung, dass es zu keine Limitierung durch die Anzahl frei verfügbarer Nukleotide, Primer oder nachlassender Polymeraseaktivität kommt. Die DNA-Polymerase des hitzestabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase) übersteht mehr als 30 Denaturierungsschritte und hat ihr Temperaturoptimum bei 68°C bis 72°C. Die Schmelztemperatur lag bei den gewählten Oligonukleotiden je nach G/C-Gehalt und Anzahl der Basen zwischen 45°C und 65°C. In Abb. 10 ist der Ablauf einer PCR schematisch dargestellt.

Die Taq-DNA-Polymerase hängt zusätzlich an das 3'-Ende jedes synthetisierten Strangs ein einzelnes, überhängendes Adenosinnukleosidtriphosphat an. Dieser 3'-Überhang ist günstig für das Klonieren von PCR-Fragmenten in stabile und selektierbare DNA-Vektoren (siehe B 12.5).

Nach Ende des letzten Zyklus erfolgt ein langer Elongationsschritt, der das Auffüllen nicht-kompletter Fragmente sowie das Anfügen der überhängenden Adenosinnukleosidtriphosphate gewährleisten soll. Der Ablauf einer PCR, sowie die exponentielle Synthese der Zielfragmente ist in Abb. 10 dargestellt.

Alle PCR wurden in Thermocyclern der Firmen Biometra® (TGradient), MJ Research (Minicycler™) und Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) durchgeführt.

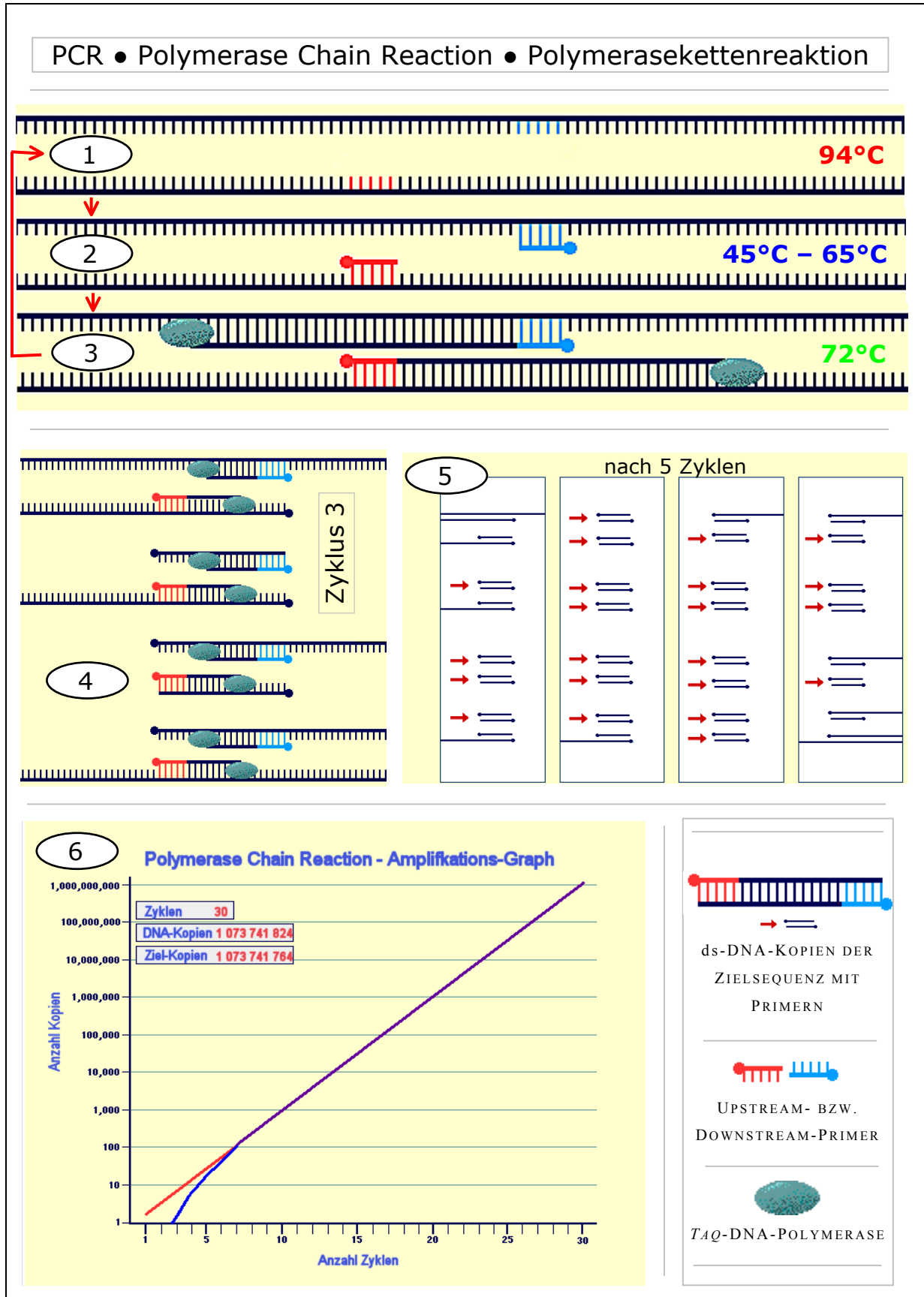


Abb. 10 PCR. Legende: siehe nächste Seite.

Abb. 10 schematischer Verlauf einer idealisierten PCR. **1-3**: Zyklus einer PCR. **1**: Denaturierung der Template-DNA. Rot und Blau markiert sind die Primerbindungsstelle. **2**: „Annealing“ der Primer. **3**: „Elongation“ ab den Primern durch die *Taq*-DNA-Polymerase. Der „Elongation“ schließt sich wieder die Denaturierung aller DNA-Stränge an (langer roter Pfeil) **4**: „Elongation“ während des dritten Zyklus. Es werden die ersten ds-DNA-Fragmente der Zielsequenz gebildet. **5**: Ergebnis nach dem fünften Zyklus. Kleine rote Pfeile markieren die synthetisierten doppelsträngigen Zielkopien (22 Fragmente) **6**: Amplifikationsgraph in halblogarithmischer Darstellung: Rote Linie: DNA-Kopien insgesamt. Blaue Linie: Anzahl amplifizierter Zielsequenzen. Abbildung nach einer „Flash“-Animation, Internet; siehe Anhang unter F9.

12.1 Primer

Alle verwendeten Primer wurden bei den Firmen Roth (Karlsruhe), GENAXIS Biotechnology GmbH (Spechbach) und bei GenTech Mainz (Prof. Dr. Hennig, Physiologische Chemie, Universität Mainz) bezogen. Die Primer wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ in einer Konzentration von 100 pmol/ μl oder 50 pmol/ μl resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Häufig wurden degenerierte Primer verwendet. Diese Primer bestehen aus einem Gemisch aus Oligonukleotiden, die sich an einer oder mehreren Positionen unterscheiden. („Wobble“-Basen) und wurden maximal mit einem Degenerierungsgrad von 512 eingesetzt. Die Erläuterung der IUPAC-Codes für Nukleinsäuren finden sich im Anhang unter F4.

12.2 PCR mit genomischer DNA

Genomische DNA als Template kam beim Flussneunauge aufgrund der zu erwartenden langen Intronsequenzen, die für die weitere Analyse wenig Bedeutung hatten, nur selten zum Einsatz. Die Elongationszeit richtete sich nach der zu erwartenden Fragmentgröße. Diese konnte allerdings nur ungenau aus Vergleichsanalysen mit IF-Genen bekannter Intron-Exon-Struktur geschätzt werden. Das gleiche galt für die Auswahl der Primer aus der codierenden Sequenz, da diese nicht auf genomischen Intron-Exon-Grenzen annealen konnten.

Standardansatz für genomische PCR:

- 1 μg genomische DNA
- 50 pmol Upstream-Primer
- 50 pmol Downstream-Primer
- 2 μl dNTP-Mix (10 mM)
- PCR-Puffer (10-fach konzentriert)
- 1,5-8 mM MgCl_2
- 2,5 Units *Taq*-DNA-Polymerase

12.3 PCR mit cDNA und Plasmiden

PCR mit cDNA als Template wurde mit cDNA aus Größenfraktionierungen (vgl. B9) oder mit der in den Banken vorhandenen Phagensuspension durchgeführt. Um Sonden zu gewinnen, wurde mit cDNA aus den jeweiligen umklonierten Plasmid-Vektoren gearbeitet. Diese ließen sich besonders gut für die Herstellung DIG-markierter Sonden verwenden (vgl. B 5.9). Eine weitere Möglichkeit war der Einsatz einzelsträngiger cDNA im Anschluss an eine reverse Transkription (siehe unten).

Standardansatz für PCR mit cDNA als Template:

10 ng bis 200 ng cDNA
10 pmol Upstream-Primer
10 pmol Downstream-Primer
1 μ l dNTP-Mix (10 mM)
PCR-Puffer (10-fach konzentriert)
0-8 mM MgCl₂
2,5 Units Taq-DNA-Polymerase

12.4 PCR mit RNA (*RT-PCR*)

Beim Einsatz von RNA als Template für die PCR muss dieses vor Beginn des Zyklus in stabilere cDNA umgeschrieben werden. Ähnlich der Erststrangsynthese für cDNA-Banken verläuft die Reverse Transkription mit dem Enzym Reverse Transkriptase und einem zur RNA umgekehrt-komplementären Primer als Synthesestarter. Dieses Oligonukleotid war häufig Poly-d(T)_n, welches die Umschreibung möglichst vieler mRNA-Moleküle vom Poly-A-Schwanz an initiieren sollte. Eingesetzt wurden jedoch auch sequenz-spezifischere Primer, die nur die Transkription von Sequenzfamilien oder auch nur einer ganz bestimmten RNA-Sequenz in cDNA veranlassen sollte. Wenn Gesamt-RNA zum Einsatz kam wurden ca. 2 μ g verwendet, Poly-A⁺ angereicherte RNA wurde mit maximal 1 μ g zum jeweiligen Ansatz hinzugefügt.

Zu Beginn einer *RT-PCR* musste die RNA bei 70°C denaturiert werden, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen (Ausnahme: Qiagen[®] OneStep PCR). Es standen mehrere Reverse Transkriptasen zur Verfügung. Die Reaktionstemperatur konnte mit den verschiedenen Enzymen variiert und auf diese Weise die Spezifität der reversen Transkription optimiert werden. So hatten die MMLV-*RT* (Stratagene, Heidelberg) und die SuperScript[™] II-*RT* (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) ein Temperaturoptimum bei 42°C, während das Enzym ThermoScript[™] (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) eine reverse Transkription bei einer Temperatur von 50 – 65°C ermöglichte. Die *RT*-Reaktionen wurden durch Inkubation bei 85°C abgestoppt und die RNA durch Zugabe von RNase H degradiert. Die entstandene einzelsträngige cDNA diente dann als Template für die sich anschließenden PCR-Zyklen (wie oben beschrieben). Im ersten Schritt des Zyklus musste erst der zur cDNA komplementäre Zweitstrang synthetisiert werden, bevor der Downstream-Primer zum ersten Mal binden kann.

Neben der Komposition der Einzelkomponenten zu individuellen Reaktionsansätzen wurden auch spezielle *RT-PCR*-Kits verwendet, die es erlauben, wie im Fall des „Qiagen[®] OneStep *RT-PCR* Kit“, die Reverse Transkription und die sich anschließende PCR in einem Reaktionsgefäß durchzuführen, oder der 5'-RACE-Kit von Gibco, mit dem noch unbekannte 5'-Enden der mRNA selektiv amplifiziert werden können.

- **Qiagen[®] OneStep RT-PCR**

Der Kit von Qiagen (Hilden) enthält ein Enzymgemisch aus Omniscript[™] und Sensiscript[™] Reverse Transkriptase sowie HotStarTaq[™] DNA-Polymerase. Letztere liegt während der reversen Transkription in inaktiver Form vor und wird nach der RT-Reaktion (50°C-55°C) durch 15 minütiges Erhitzen bei 95°C aktiviert. Der Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

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

Das 5'-RACE-System der Firma Gibco Life Technologies (Karlsruhe) ermöglicht die Amplifizierung von Fragmenten aus dem 5'-Bereich einer mRNA, dessen Sequenz unbekannt ist. Die Methode stellt eine modifizierte RT-PCR dar, bei der zusätzlich mit Hilfe der terminalen Transferase ein Poly-d(C) Schwanz an den DNA-Strang der reversen Transkription angehängt wird („tailing“). An diese Cytosine kann dann ein oligo-d(G)-Primer („abridged-anchor-primer“, AAP) binden und in der sich anschließenden PCR das Fragment zwischen diesem und einem Downstream-Primer amplifiziert werden. Der Kit wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

12.5 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die gewünschten PCR-Fragmente konnten nach elektrophoretischer Auftrennung und anschließender Gelextraktion in Plasmidvektoren ligiert werden. Dafür wurde zuerst die Konzentration der extrahierten DNA bestimmt, um ein optimales Mengenverhältnis von „Vektor : Insert“ von 1:3 einstellen zu können. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurden pGEM-T Easy, pGEM-T (beide Promega, Mannheim) bzw. pCR[®] 2.1 TOPO[®] oder pCR[®] 4 TOPO[®] (beide Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Diese Plasmidvektoren lagen linearisiert vor und trugen an beiden Enden ein überhängendes 3'-Deoxythymidin. Damit waren sie kompatibel zur Klonierung von PCR-Produkten, die ein 3'-überhängendes Adenosintriphosphat an beiden Seiten trugen. Bei dem pGEM-System katalysiert die T4-DNA-Ligase die Verbindungen der Insert-Vektor-Sequenzen. Bei den TOPO-Plasmiden schneidet die kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I vom *Vaccinia*-Virus das Phosphodiester-Rückgrat an einem Strang der DNA an einer bestimmten Erkennungsstelle (<5'-CCCTT-3'>). Die dabei freiwerdende Energie wird dazu verwendet, die Lücke zwischen dem Insert und dem Vektor zu schließen. Dadurch wird eine eingegangene Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Strangs und der Hydroxylgruppe eines Tyrosylrestes der Topoisomerase durch den Angriff des 5'-OH des PCR-Produkts wieder aufgehoben (Shuman, 1991; 1994).

Die Ligationsansätze wurden vollständig in kompetente Bakterien des *E. coli* Stammes XL-1 Blue MRF' oder TOP 10 transformiert und auf IPTG / X-Gal-haltigen LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Über Blau-Weiß-Selektion konnten solche Bakterienklone identifiziert werden, die erfolgreich transformiert waren.

13. DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von den Firmen SeqLab (Göttingen) nach dem „Taq Dye Terminator Cycle Sequencing“-Prinzip durchgeführt. Die Primer zum Sequenzieren (vgl. B 12.1) wurden, falls bei den Firmen nicht vorhanden, zusammen mit den Proben in einer Konzentration von 10 pmol/ μ l mitgeschickt. Die Ausgabe der uneditierten Daten (DNA-Sequenz als Text und Chromatogramm) erfolgte per E-Mail.

14. Sequenzauswertung am Computer

14.1 Programme

Die primären DNA-Sequenzdaten wurden mit Hilfe der DNA-Analyseprogramme „Align“, „Lalign“, „Translate“, „The Protein Machine“, „WebCutter“ (alle Internet), „Chromas“ und „ClustalX“ (beide Windows) bearbeitet.

Auswahl und Eigenschaften von Oligonukleotiden berechneten Internetprogramme wie „Primer selection“, „Primer calculator“, „Oligo-properties calculator“, sowie das DOS-Programm „Oligo“.

Die Bearbeitung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen erfolgte mit „Align“, „Lalign“, „Expassy-Tools“ (Internet) und „ClustalX“ (Windows). Theoretische tryptische Spaltungen von Aminosäuresequenzen wurden mit „PeptideMass“ simuliert, mögliche posttranslationale Modifikationen der tryptischen Fragmente berechnete das Programm „FindMod“ (beide Internet).

Das Internetprogramm „Blast“ wurde verwendet, um Ähnlichkeiten zu schon bekannten Sequenzdaten festzustellen und damit eine Identifizierung und Einordnung neuer Sequenzen zu ermöglichen. Suchen nach ähnlichen DNA-Sequenzen (BlastN), Proteinsequenzen (BlastP) oder die Übersetzung der DNA-Sequenz in alle sechs möglichen Leseraster und Vergleich dieser mit Proteindatenbanken (BlastX) wurden durchgeführt. Datenbankabgleiche von gemessenen MALDI-MS-Fragmentmassen mit bekannten Proteinen konnten mit „PeptIdent“ durchgeführt werden.

Das Windows-Programm ClustalX berechnet Sequenzvergleiche („Alignments“) von multiplen DNA- und Aminosäuresequenzen. Anhand der Alignments konnten mit „MEGA“ (Windows) Identitätstabellen errechnet werden. Des Weiteren sind sie Grundlage für Distanzmatrizes und molekulare Stammbäume, die mit „MEGA“ und „PHYLIP“ (Windows) berechnet wurden. Zum Bearbeiten und Konvertieren der Alignments wurde das Windows-Programm „GeneDoc“ verwendet, molekulare Stammbäume wurden mit „Treeview“, „Tree-Explorer“ (MEGA) und „Treecon“ (Windows) dargestellt. Im Anhang sind unter F9 die Internetadressen der Programme aufgeführt.

14.2 Molekulare Phylogenie

Die als Grundlage für phylogenetische Berechnungen erstellten Proteinsequenz-Alignments wurden nach den Standardeinstellungen von ClustalX berechnet (Thompson et al., 1997).

Von diesen ausgehend wurden mit dem Software-Paket „PHYLIP“ nach dem „Jones-Taylor-Thornton-Modell“ (JTT) Distanzen zwischen den Sequenzen errechnet (Programm: „PROTDIST“). Die JTT-Matrix ist eine Erweiterung der „PAM 001-Matrix“ von Dayhoff, bei der die Häufigkeit von bestimmten Aminosäureaustauschen statistisch erfasst wurde (Dayhoff et al., 1979; Jones et al., 1992). Phylogenetische Bäume wurden daraufhin nach der Neighbor-Joining-Methode berechnet (Saitou und Nei, 1987; Programm: „NEIGHBOR“). Diese Methode entwirft Abstammungslinien und Verzweigungspunkte auf Grundlage der Distanzmatrix. Der entstehende Baum enthält keine Angaben über evolutionäre Richtungen.

Um die Sicherheit einer Verzweigung innerhalb des phylogenetischen Baums statistisch zu berechnen wurde das Alignment einem sogenannten „Bootstrapping“ unterzogen (Programm: „SEQBOOT“). Dabei werden von einem alignierten Datensatz zufällige Variationen einzelner Aminosäurepositionen erzeugt (i. d. R. in 100-facher Ausführung). Das bedeutet, dass in jedem der Datensätze einige Positionen verdoppelt, andere deletiert werden. Von den multiplen Datensätzen wurden wiederum jeweils die Distanzmatrix und mittels Neighbor-Joining molekulare Stammbäume berechnet. Das Programm „CONSENSE“ vereinigt die am häufigsten gewählten Verzweigungen der multiplen Datensätzen in einem Baum. Die Häufigkeit einer Verzweigung wird durch den Bootstrap-Wert definiert. Ist er hoch (>90%), liegt eine relative statistische Absicherung der Verzweigung vor.

Parallel zu den Evolutionsmodellen wurden zur Überprüfung der Ergebnisse mit dem Programm MEGA aus den von ClustalX erstellten Alignments Distanzen mit einer rein mathematischen Methode zur Errechnung von Sequenzdistanzen („poisson-correction“) errechnet. Dieser Algorithmus berücksichtigt zwar multiple Substitutionen von Aminosäuren an einer Position, behandelt jedoch jeden Austausch gleich gewichtet. Er stellt damit kein Evolutionsmodell dar.

Aus diesen Distanzmatrizes wurden wiederum nach der Neighbor-Joining-Methode molekulare Bäume erstellt und durch Bootstrapping überprüft. Unterschiede zwischen diesen und den nach JTT korrigierten Bäumen gaben ebenfalls Hinweise auf bislang weniger gut gesicherte Verzweigungen innerhalb der Evolution der IF-Proteine.

Identitätstabellen wurden nach der „p-distance“-Methode (proportion) berechnet. Dabei wird die Anzahl der aufgetretenen Aminosäureunterschiede in zwei Sequenzen durch die Anzahl der insgesamt verglichenen Positionen dividiert. Nach dieser Methode berechnete Identitätswerte beinhalten keine Korrektur möglicher multipler Substitutionen (Nei und Kumar, 2000).

15. Biochemische Methoden

15.1 Biochemische Präparation der Intermediärfilamente (Cytoskelettpräparation)

Hierbei nutzte man insbesondere zwei physikochemische Eigenschaften der Intermediärfilamente aus, die im Gegensatz zum Charakter der meisten anderen Proteine stehen:

- IF lösen sich schlecht bzw. gar nicht in nicht-ionischen Detergenzien (z.B. Triton)
- IF lösen sich schlecht in Hochsalzlösungen (zB KCl, NaCl)

• Extraktionslösungen

Niedrigsalzpuffer: 150 mM NaCl
10 mM Tris/Cl pH 7,2
5 mM EDTA
1% Triton X 100

Hochsalzpuffer: 1,5 M KCl
10 mM Tris/Cl pH 7,2
5 mM EDTA
1% Triton X 100

TE (Tris / EDTA): 10 mM Tris/Cl pH 7,2
5 mM EDTA

Erst kurz vor Gebrauch der jeweiligen Pufferlösungen wurde eine 0,38 M Stammlösung PMSF (= 66 mg/ml; **Phenylmethylsulfonylfluorid**) in Ethanol p.A oder Methanol p.A angesetzt. Davon wurden pro 1 ml Extraktionspufferlösung 7,5 µl der PMSF-Stammlösung zugegeben, so dass die Endkonzentration 2 mM betrug. Des Weiteren wurde ein Gemisch aus wasserlöslichen Protease-Inhibitoren zu jedem Extraktionspuffer hinzugefügt, für die sich folgende Endkonzentrationen ergaben:

Leupeptin 4 µg/ml (Stammlösung: 5 mg/ml)

Benzamidin 1 mM (Stammlösung: 2 M)

Pepstatin 0,7 µg/ml (Stammlösung 1 mg/ml)

• Gewebepreparation

Verwendet wurde dazu ein Ultra-Turax der Firma Jahnke & Kunkel (Staufen i.Br.). Alle Arbeitsschritte wurden generell auf Eis durchgeführt. Zunächst erfolgte ein gründliches Homogenisieren (mehrfach höchste Stufe) des Gewebes in einem 50 ml Kunststoffschraubgefäß (Falcon, Greiner) mit ca. vierfachem Volumen vorgekühltem Niedrigsalzpuffer. Anschließend wurde das Homogenisat für 10 Minuten mit 15000 rpm im SS34 Rotor einer Sorvall Kühlzentrifuge (RC5B) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment in gleichem Volumen eiskaltem

Hochsalzpuffer aufgenommen und wiederum mit dem Ultra-Turax homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) konnte das Sediment weiteren Hochsalzextraktionen unterworfen oder gleich weiter verarbeitet werden. Dazu wurde das Sediment in ein oder mehrere Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt. Um nach abgeschlossenen Extraktionsschritten überschüssiges Salz und Detergenz aus dem Sediment zu entfernen, wurde dieses nun mehrmals mit einem geeigneten Volumen TE-Puffer gewaschen, d.h. erst resuspendiert, danach wieder zentrifugiert (5 min Mikroliter Tischzentrifuge 100%; Fa. Hettich - Tutlingen) und der Überstand jeweils dekantiert. Nach dem letzten Waschgang wurden die Sedimente entweder bei -80°C eingefroren und gelagert oder direkt zur Analyse ihrer Intermediärfilament-Proteine für die entsprechenden Elektrophoresen vorbereitet.

15.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Minigelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um ausschließlich Proteingrößen zu überprüfen, wurde eine Minigelelektrophorese durchgeführt (Laemmli, 1970, modifiziert). Dieses denaturierende, diskontinuierliche System besteht aus Trenn- und Sammelgel, die sich sowohl im Vernetzungsgrad als auch im pH-Wert unterscheiden.

Elektrophoresekammer: PHERO-minivert, Biotec Fischer (Reiskirchen).

Elektrophoreseplatten: Größe 80×82 mm.

Modifikation: Verwendung von DTT anstatt β -Mercaptoethanol als reduzierendes Agens.

Gellösungen

Protogel Acrylamidlösung (Stocklösung; Helmut Schröder; Stuttgart)	30:0,8; (30% (w/v) Acrylamid, 8% (w/v) Bisacrylamid	
4 × Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl 0,4% SDS	pH 6,8
4 × Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl 0,4% SDS	pH 8,8
Polymerisations-Starter	10% Ammoniumpersulfat in dest. H ₂ O TEMED (N,N,N',N' - Tetramethylenethylendiamin)	
Elektrophoresepuffer:	23,0 mM Tris 190 mM Glycin 0,2% SDS	
Probenpuffer:	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8 25,0 mM Dithiothreitol 10,0% (w/v) Glycerin 3,0% SDS 0,1% Bromphenolblau	DTT, wird frisch hinzugegeben

Trenngelmischung:

- 30% Acrylamid Stocklösung bis zur gewünschten Konzentration verdünnen
- 4 × Trenngelpuffer bis zur einfachen Konzentration verdünnen
- Auffüllen bis zum Endvolumen mit dest. H₂O
- Zugabe von 100 µl 10% Ammoniumpersulfat und 10 µl TEMED pro 10 ml Trenngelmischung

Sammelgelmischung:

- 30% Acrylamid Stocklösung bis zur gewünschten Konzentration verdünnen
- 4 × Sammelgelpuffer bis zur einfachen Konzentration verdünnen
- Auffüllen bis zum Endvolumen mit dest. H₂O
- Zugabe von 100 µl 10% Ammoniumpersulfat und 10 µl TEMED pro 10 ml Trenngelmischung.

Es wurden 10% Polyacrylamidgele im Format 80 × 82 mm und 1 mm Dicke hergestellt. Die gut gemischte Trenngellösung wurde bis 1 cm vor dem oberen Rand zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch entsprechende Abstandhalter voneinander getrennt waren. Zum Abdichten wurden die Glasplatten vorher außen mit Klebeband umklebt und von innen mit 1%-iger Agarose beschichtet. Die eingefüllte Trenngellösung wurde umgehend mit Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation (ca. 30 Minuten) wurde die Geloberfläche gründlich mit destilliertem Wasser gespült und die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig mit einem saugfähigen Papiertuch weitgehend entfernt. Unmittelbar nach dem Eingießen der Sammelgelmischung (3,9% Acrylamid) wurde ein Probenkamm (8 Taschen) luftblasenfrei eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisation (20 Minuten) wurden Kamm und Klebeband entfernt, die Geloberfläche mit H₂O_{dest} gespült und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Oberer und unterer Puffertank wurden mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt.

- **Probenvorbereitung**

Das Sediment der IF-Proteine wurde mit 10 µl Laemmli-Probenpuffer versetzt, fünf Minuten bei 95°C denaturiert, kurz zentrifugiert und der Überstand danach in die Taschen des Minigels geladen. Als Molekulargewichtsmarker wurde das Proteingemisch „SDS-6H“ von Sigma (Deisenhofen) verwendet:

Myosin	M _r	205000
β - Galactosidase	M _r	116000
Phosphorylase b	M _r	97400
Rinderserumalbumin (BSA)	M _r	66000
Ovalbumin	M _r	45000
Carboanhydrase	M _r	29000

- **Elektrophoresedurchführung**

Das Markergemisch und die Proben wurden in die Geltaschen geladen, das obere Pufferreservoir mit der Kathode und der untere Puffertank mit der Anode verbunden. Die Elektrophorese erfolgte

anfänglich mit einer konstanten Stromstärke von 15 mA/Gel, nach dem Einwandern der Proteine in das Trenngel mit 25 mA/Gel. Die SDS-PAGE wurde abgebrochen, sobald die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

15.3 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) erfolgte nach der von O'Farrell beschriebenen Methode (O'Farrell, 1975; O'Farrell et al., 1977). Dabei wurden die Proteine in der ersten Dimension über einen pH-Gradienten, in der zweiten Dimension unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer relativen Molekülmasse aufgetrennt. Für die 2D-Gelelektrophorese wurde die vertikale Elektrophoresekammer Phero-vert-180 (für zwei Gele à 180 × 170 mm) mit 2D-Riegeln zur Aufnahme von jeweils 7 Glasröhrchen (Innen-Ø 3 mm, 130 mm lang, Außen-Ø 6 mm) von der Firma Biotec Fischer (Reiskirchen) verwendet.

• Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei neutralen bis sauren Proteinen wurde das System der isoelektrischen Fokussierung gewählt, bei dem ein stabiler pH-Gradient aufgebaut wird. Die Polypeptide wandern von der Kathode (basischer Puffer) zur Anode (saurer Puffer) bis zu ihrem isoelektrischen Punkt. Die Elektrophorese erfolgte in Polyacrylamid-Rundgelen.

Präparation der Rundgele:

Die Rundgellösungen wurden in mit Aceton gereinigten Glasröhrchen (Länge: 13 cm, Ø 3 mm) gegossen. Das untere Ende wurde vorher mit Parafilm verschlossen. Die Zugabe der Ampholine erfolgte erst nach Lösen des Harnstoffes.

Zusammensetzung des Fokussierungsgels:

5,70 g Harnstoff
1,33 ml 30% 2D-Acrylamid
2,00 ml 10% NP-40 Lösung
2,00 ml H₂O
0,20 ml Ampholine pH 4-6
0,20 ml Ampholine pH 5-7
0,10 ml Ampholine pH 3,5-10
10,00 µl APS
7,00 µl TEMED

Der untere Puffertank wurde mit 10 mM H₃PO₄ (Anodenpuffer) aufgefüllt.

Vorbereiten der Proben

Die Sedimente der Cytoskelett-Präparationen aus den Geweben wurden in geeignetem Volumen (etwa 30 µl) Lysis A aufgenommen und gelöst. Einige Kristalle Harnstoff und 3 µg der oben genannten

Markerproteine wurden pro Gel hinzugefügt. Die Rundgele wurden nach Entfernung des Parafilms ca. 1 cm aus dem Röhrchen herausgedrückt und mit einer Gaze verschlossen. Die Proben wurden luftblasenfrei auf die Rundgele pipettiert, jeweils mit 20 µl Lysis K überschichtet und mit 20 mM NaOH (Kathodenpuffer) bis zum oberen Rand aufgefüllt. Danach folgte das Füllen des oberen Tanks mit Kathodenpuffer.

Elektrophorese

Nach Anschluss der Elektrophoresekammer an das Netzgerät erfolgte der Lauf 30 Minuten bei einer konstanten Spannung von 200 V, 30 Minuten bei 300 V und 16-18 Stunden bei 400 V. Nach der Elektrophorese wurden die Rundgele mit einer luftgefüllten Spritze in ein Kunststoffpetrischälchen herausgedrückt und 20 Minuten zur Entfernung von Harnstoff und NP-40 in O-Puffer äquilibriert. Die Orientierung des Rundgels (saurer bzw. basisches Ende) wurde notiert, anschließend der O-Puffer abgesaugt und die Gele auf die Flachgele der zweiten Dimension aufgetragen.

Gellösungen und Puffer:

Lysis-Puffer A	9,5 M Harnstoff	
	2,0% (w/v) Nonidet P-40	
	25 mM DTT	
	0,8% Ampholine	pH 4-6
	0,8% Ampholine	pH 5-7
	0,4% Ampholine	pH 3,5-10
Lysis-Puffer K	6 M Harnstoff	
	0,4% Ampholine	pH 4-6
	0,4% Ampholine	pH 5-7
	0,2% Ampholine	pH 3,5-10
30% (w/v) 2D-Acrylamid (28,38 : 1,62)	28,38 g Acrylamid	
	1,62 g Bisacrylamid	ad 100 ml
	H ₂ O	
10% (w/v) Nonidet P-40	Nonylphenyl-polyethylenglycol in destilliertem Wasser	
Anodenpuffer	10 mM H ₃ PO ₄	
Kathodenpuffer	20 mM NaOH	
O-Puffer	60 mM Tris/HCl	pH 6,8
	2% SDS	
	20 mM DTT	
	10% (w/v) Glycerin	

Lysis Puffer A und Lysis Puffer K wurden in Aliquots bei -20°C eingefroren, die übrigen Lösungen stets frisch angesetzt.

- **Zweite Dimension: SDS-PAGE**

Die SDS-Polyacrylamid-Vertikalgele der zweiten Dimension wurden wie oben beschrieben hergestellt. Verwendet wurden hier allerdings Glasplatten der Größe 180 × 170 mm und Abstandhalter der Stärke 1,5 mm. Das Sammelgel wurde direkt, ohne Kamm, bis an den Rand der Ohrenplatte (Schliffseite der Ohrenplatte nach innen) gegossen. Die äquilibrierten Rundgele der ersten Dimension wurden in den Schliff gelegt (saure Seite rechts - basische Seite links) und mit aufgekochter 1%-iger Agarose in O-Puffer überschichtet. Die Agarose-O-Puffer Mischung enthielt Bromphenolblau als Farbmaler. Die Elektrophorese begann, nach Einfüllen des Elektrophoresepuffers, mit einer konstanten Stromstärke von 25 mA/Gel und wurde nach Einwandern der Laufmittelfront in das Sammelgel auf 40 mA/Gel gesteigert. Die SDS-PAGE wurde abgebrochen, sobald die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Die Gele wurden anschließend gefärbt oder für einen Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen verwendet.

O-Puffer-Agarose: 1,00% Agarose in O-Puffer
0,01% Bromphenolblau

Markerproteine:

	M_r	pI
Rinderserumalbumin (BSA)	66000	6,1
Aktin aus Kaninchenmuskel	42000	5,4

- **Gelfärbung mit Coomassie Brilliant Blue**

Der Farbstoff wurde zunächst über Nacht unter Rühren in Methanol gelöst. Anschließend wurde Essigsäure hinzugefügt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Danach wurde die Lösung durch einen 595 ½ Faltenfilter Ø 185 mm der Firma Schleicher und Schuell (Dassel) filtriert.

Nach der Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele nach Entfernen des Sammelgels in der Färbelösung eine Stunde (Minigele) oder 2-3 Stunden bzw. über Nacht (große 2D Gele) gefärbt. Danach wurden die Gele in Entfärbelösung entfärbt.

Färbelösung 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva)
40,0% Methanol
7,5% Essigsäure

Entfärbelösung 20,0% Isopropanol
7,5% Essigsäure

15.4 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose- und PVDF-Membranen

- **Transfer der Proteine mit dem Nassblotverfahren**

Die Proteine wurden mit dem Nassblotverfahren (Herrmann und Wiche, 1987) elektrisch auf Nitrocellulose- (Typ BA85, Porengröße 0,45 µm, Sartorius, Göttingen) oder PVDF-Membranen (Pro Blott™ Membran, Applied Biosystems, Weiterstadt) transferiert. Vewendet wurde die Nassblotkammer PHERO - Blott (Volumen 3 Liter) von der Firma Biotec Fischer (Reiskirchen).

Die PVDF-Membran musste vor dem Proteinübertrag kurz in 100% Methanol eingeweicht werden, die Nitrocellulose wurde vor Gebrauch kurz im Transferpuffer hydratisiert. Gele wurden für den Transfer 20 min in Boratpuffer äquilibriert. Zum Transfer wurde die Membran in einer speziellen Vorrichtung auf das Gel gepreßt (Sandwich mit der Abfolge Anode - Gelhalter - Schwamm - 2 Whatman® 3 MM Filter - Nitrocellulosemembran - Gel - 2 Whatman® 3 MM Filter - Schwamm - Gelhalter - Kathode) und das gesamte Sandwich in die Nassblotkammer eingespannt. Schwämme, Whatman® 3 MM Filter und die Membran wurden vor Verwendung gründlich mit Boratpuffer durchtränkt. Der Transfer erfolgte bei maximaler Stromstärke (ca. 340 mA) über Nacht im Kältelabor, die Stromstärke wurde anfangs alle 5 Minuten in Schritten von 100mA gesteigert.

Transferpuffer 25 mM Borsäure
2 mM EDTA
pH 8,8

- **Transfer der Proteine mit dem halbtrockenen Blotverfahren**

Für den Transfer von Proteinen aus Minigelen wurde meist das halbtrockene Elektro-Blotverfahren (Khyse-Andersen, 1984) angewandt.

Vor Transferbeginn wurde die Nitrocellulosemembran 5 Minuten in Puffer 1 äquilibriert. Gele wurden vor dem Transfer 10 Minuten in Puffer 3 äquilibriert. Der Blotaufbau in einer Graphit-Blotkammer (CTI, Idstein) ist in Abb. 11 schematisch dargestellt. Der Proteinübertrag erfolgte für 1,5-2 h bei RT mit einer Stromstärke von 0,9mA/cm² Gelfläche.

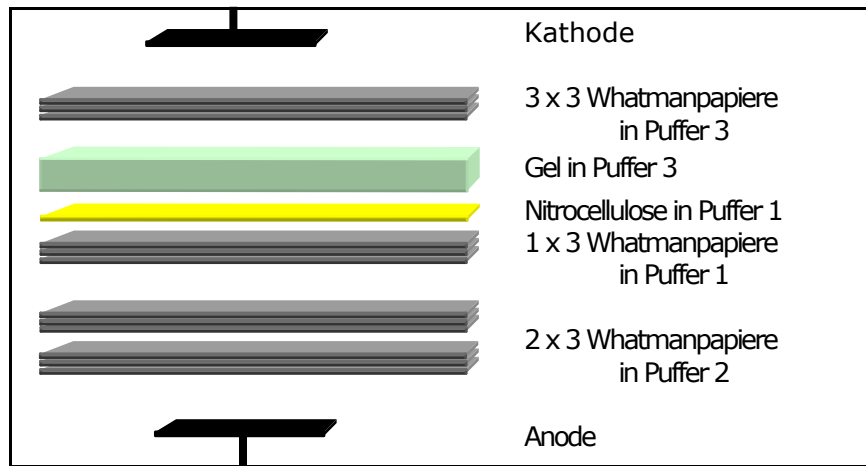


Abb. 11 Aufbau eines „Semi-Dry Blots“

Puffer 1 25mM Tris/HCl pH 10.4
20% Methanol

Puffer 2 300mM Tris/Cl pH 10.4
20% Methanol

Puffer 3 40mM Norleucin
25mM Tris/HCl pH 9.4
20% Methanol

• Reversible Färbung der Proteine mit Ponceau S

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose- bzw. die PVDF-Membran für 5 min in 1:10 verdünnter Ponceau S-Lösung (Sigma, Deisenhofen) gefärbt und kurz in destilliertem Wasser entfärbt. Nach dem Zurechtschneiden der Membranen auf ein Minimum wurden diese in trockenem Zustand mit Durchlicht mit einem „Video-Copy-Processor“ (Mitsubishi) auf einem Videoausdruck festgehalten und bei ausreichender Farbintensität auch mit einer Digitalkamera fotografiert (DSC-S70; Sony). Zusätzlich wurden das Proteinmuster und die Membranbegrenzungen zur späteren Zuordnung von Positivreaktionen auf transparente Folie übertragen. Die Blots wurden entweder direkt weiterverwendet oder trocken zwischen Whatman® 3 MM Filtern aufbewahrt.

15.5 Immunblot

Mit diesem Verfahren konnten auf Nitrocellulosemembranen immobilisierte Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen und identifiziert werden.

Die Nitrocellulosemembran wurde in destilliertem Wasser rehydratisiert und anschließend bei RT mindestens eine Stunde in Blockierungspuffer abgesättigt.

- **Inkubation mit dem primären Antikörper**

Verwendet wurden monoklonale Maus-Antikörper und polyklonale Meerschweinchen-Antikörper. Monoklonale Antikörper wurden als Medienüberstand unverdünnt oder bis 1:20 verdünnt in TBST, Seren und Ascitesflüssigkeit 1:200 bis 1:1000 verdünnt in TBST und polyklonale Antikörperseren 1:1000 bis 1:5000 eingesetzt. Die Membran wurde zusammen mit der primären Antikörper-Lösung in Folie eingeschweißt (Doppelnachtschweißgerät) und über Nacht bei 8°C auf einer Drehplatte (Eigenbau der Feinwerkstatt, Uni Mainz) inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen in TBST entfernt.

- **Inkubation mit dem sekundären Antikörper und Enzymreaktion**

Die Inkubation der Membran erfolgte 60 Minuten bei RT mit 1:7250 - 1:7500 verdünnten Ziege-Anti-Maus (IgG + IgM)- bzw. Ziege-Anti-Meerschweinchen (IgG)-Antikörper (Dianova Hamburg), die mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt waren. Überschüssiger Antikörper wurde durch mehrfaches Waschen der Membran mit TBST entfernt. Die Enzymreaktion erfolgte wie unter Kapitel B16 beschrieben.

TBST 10 mM Tris/HCl pH 8,0
 140 mM NaCl
 0,1% Tween 20

Blockierungspuffer 10% Ziegenserum Donor Herd (Sigma, Deisenhofen)
 oder
 5% Milchpulver in TBST

15.6 Biotinylierung von Proteinen

Das zu biotinylierende Protein wurde in einer Konzentration von 1mg/ml eingesetzt (Ansatz, wenn nötig, mit TBS verdünnen). Je ml Proteinlösung wurden 50 µl BNHS-Lösung hinzugegeben und anschließend nach kurzem Mischen 1h bei RT inkubiert. Danach erfolgte über Nacht bei 8°C eine Dialyse (Dialyseschlauch Visking der Firma Roth, Karlsruhe; vor Gebrauch 5 min auskochen) des Reaktionsansatzes gegen TBS. Das markierte Protein wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

BNHS 1mg/ml Biotinyl-N-hydroxysuccinimid in Dimethylformamid

TBS 20mM Tris/HCl pH 7,6
 137mM NaCl

15.7 Complementärer-Keratin-Blot-Bindungs-Test (CKBB-Test)

Bei dieser Methode nutzte man die Eigenschaft der Keratine aus, Heterodimere mit einem Partnermolekül des jeweils anderen Typs zu bilden. Mit Hilfe des Complementären-Keratin-Blotbindungs-Tests konnten so auf Nitrocellulose immobilisierte Keratine identifiziert und dem Typ I bzw. Typ II zugeordnet werden. Zur Identifizierung der Typ I-Keratine wurde die Membran mit biotinyliertem humanen Keratin 8 (Typ II), zur Identifizierung der Typ II-Keratine mit biotinyliertem humanen Keratin 18 (Typ I) inkubiert. Die rekombinanten humanen Keratine wurden freundlicherweise von Dr. H. Herrmann (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Bindungspuffer 4 M Harnstoff
 10 mM Tris/HCl pH 8,0
 3% BSA
 0,1% Tween 20

Hochsalzextraktions-Puffer 1,5 M NaCl
 0,5% Triton-X-100
 30 mM KCl
 10 mM Tris/HCl pH 8,0
 0,1% Tween 20

TBST 10 mM Tris/HCl pH 8,0
 150 mM NaCl
 0,1% Tween 20

• Filterbehandlung

Der Nitrocellulosefilter wurde zunächst 1 Stunde bei RT in 1 × TBST blockiert ("Renaturierung der geblohteten Proteine"). Pro Filter wurden 2-3 ml Inkubationslösung angesetzt. Dazu wurden 15-30 µg markiertes Protein in 2-3 ml Bindungspuffer gelöst. Anschließend wurde jede Membran mit dem entsprechenden Volumen Inkubationslösung in Folie eingeschweißt und auf einem Drehbrett über Nacht bei 8°C inkubiert. Danach wurden die Filter 4-6 × 10-15 Minuten bei RT in Hochsalzextraktionspuffer gewaschen und direkt anschließend die gebundenen, biotinmarkierten Keratine nachgewiesen.

• Streptavidinbindung

Die Filter wurden 1h mit 10% Milchpulver in TBST blockiert und anschließend 1h bei RT mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (Promega, Mannheim) 1: 5000 in 5% Milchpulver in TBST verdünnt inkubiert. Es folgten 4 Waschungen der Membranen, jeweils 15 min mit TBST. Direkt anschließend wurde die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase durchgeführt (Kapitel B16).

16. Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase

Die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase beruht auf der Umsetzung des Substrates BCIP zu einem unlöslichen blauen Farbstoff unter Anwesenheit des Katalysators NBT.

Die Enzymreaktion erfolgte mit einer Substratlösung, die direkt vor Gebrauch frisch aus 3,3 µl BCIP und 6,6 µl NBT pro ml AP-Puffer angesetzt wurde. Vor der Färbung wurde die zu detektierende Membran kurz in AP-Puffer äquilibriert und dann mit so viel Färbelösung überschichtet, dass sie an allen Stellen von dieser bedeckt war. Kurze Inkubationen fanden bei RT statt, längere bei 4°C-8°C in Dunkelheit. Die Farbentwicklung wurde nach einer Minute bis 48 Stunden durch Waschen der Membran mit Wasser beendet und die Reaktion gegebenenfalls durch Scannen oder Fotografieren dokumentiert.

AP-Puffer (pro Liter)	0,10 M Tris 0,10 M NaCl 0,05 M MgCl ₂	pH: 9,5
Substrat NBT	50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid	(NBT=p-Nitrobluetetrazoliumchlorid)
Substrat BCIP	50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid	(BCIP=5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz)

17. „Peptide Mass Mapping“ mit MALDI-Massen-Spektrometrie (MALDI-MS)

Die massenspektrometrischen Untersuchungen MALDI-MS (matrix-assisted laser-desorption/ionization-mass spectrometry) wurden von Dr. Christian Hunzinger (Fa. Proteosys, Mainz), sowie von Dr. Martina Schnölzer und Dr. Hans Heid am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg durchgeführt.

Dazu wurden Proteinflecke aus einem Coomassie-gefärbten 2D-Gel (vgl. B 15.3) tryptisch verdaut. Die entstandenen Peptidfragmente wurden in einer Matrix (α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure) verteilt und durch einen UV-Laser-Impuls in Gasphase ionisiert. Durch ein elektrisches Feld wurden die protonierten Bruchstücke sehr stark beschleunigt, durch eine Röhre geschickt und mittels Detektor die Flugzeit gemessen (time of flight). Dabei sind kleine Moleküle schneller als große, und aus den für die Flugstrecke benötigten Zeiten lassen sich die Fragmentmassen errechnen (Lottspeich, 1999; McDonald und Yates, 2000).

Verglichen wurde das erhaltene Ergebnis mit dem theoretischen tryptischen Verdau der aus cDNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen oder mit Proteindatenbanken („PeptideMass“, „FindMod“, „Peptident“, Internet-Adressen unter F9 im Anhang, (Wilkins et al., 1997; Wilkins und Williams, 1997). Da die Fragmente protoniert wurden, erhöhte sich ihre gemessene Masse um den Wert +1. Methionin-enhaltende Fragmente konnten durch die Oxidation des Schwefels zum Sulfid fakultativ eine zusätzliche Sauerstoffatommasse (+16) enthalten. Berücksichtigt wurden auch Fragmente mit ein bis zwei übersprungenen tryptischen Schnittstellen.

C Ergebnisse

1. Einführung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit habe ich den Versuch unternommen, vom Flussneunauge *Lampetra fluviatilis* über cDNA-Untersuchungen möglichst viele Aminosäuresequenzdaten der Keratine und Typ III Intermediärfilament-Proteine zu erhalten und diese mit den von Brauer (1993) und mir selbst ermittelten biochemischen Daten in Beziehung zu setzen.

Um cDNA-Sequenzdaten zu erhalten, wurden „Screenings“ der cDNA-Expressionsbanken durchgeführt. Dies geschah entweder mit Antikörpern, die gegen IF-Proteinepitope gerichtet sind, oder mit DNA-Sonden aus cDNA-Klonen anderer Organismen, die für Keratine bzw. Typ III-IF-Proteine codieren. Eine alternative Strategie bestand darin, PCR-Reaktionen mit degenerierten Primern durchzuführen, um so Teilsequenzen zu erhalten, die dann wiederum als Sonden für die cDNA-Banken eingesetzt werden konnten. Die Primer für diese PCR-Reaktionen wurden aus Vergleichen stärker konservierter Regionen innerhalb der schon von anderen Vertebraten bekannten Sequenzen ermittelt. Der Beginn und das Ende der helikalen Rodregion (Coil 1A und Coil 2B) waren bspw. dafür geeignete Positionen. Jedoch auch Sequenzmotive in der Kopf- und Schwanzregion konnten gut als Vorlage für die Synthese solcher Primer genutzt werden (Abb. 12).

Nach Ermittlung der primären cDNA-Sequenzen und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurde über Datenbankvergleiche die mögliche Einordnung in einen IF-Protein-Typ vorgenommen. Im Anschluß an die Analyse der Sequenzen war es häufig mittels „Peptide Mass Mapping“ (über MALDI-MS) möglich, unter Zuhilfenahme der Ergebnisse des Complementären-Keratin-Blot-Bindungs-Tests (CKBB), den Sequenzdaten die biochemisch identifizierten Keratine und Typ III-IF-Proteine zuzuordnen und so auch Hinweise auf den jeweiligen Expressionsort zu erhalten. Diese Kombination der Ergebnisse ergab zusätzlich die Möglichkeit, die Flussneunauge-Keratinsequenzen in Typ I- und Typ II- sowie in „E“- und „S“-Keratine einzuteilen. Aus der Zusammenführung der Daten konnte ein Expressionskatalog der ermittelten IF-Proteinsequenzen des Flussneunauges aufgestellt werden.

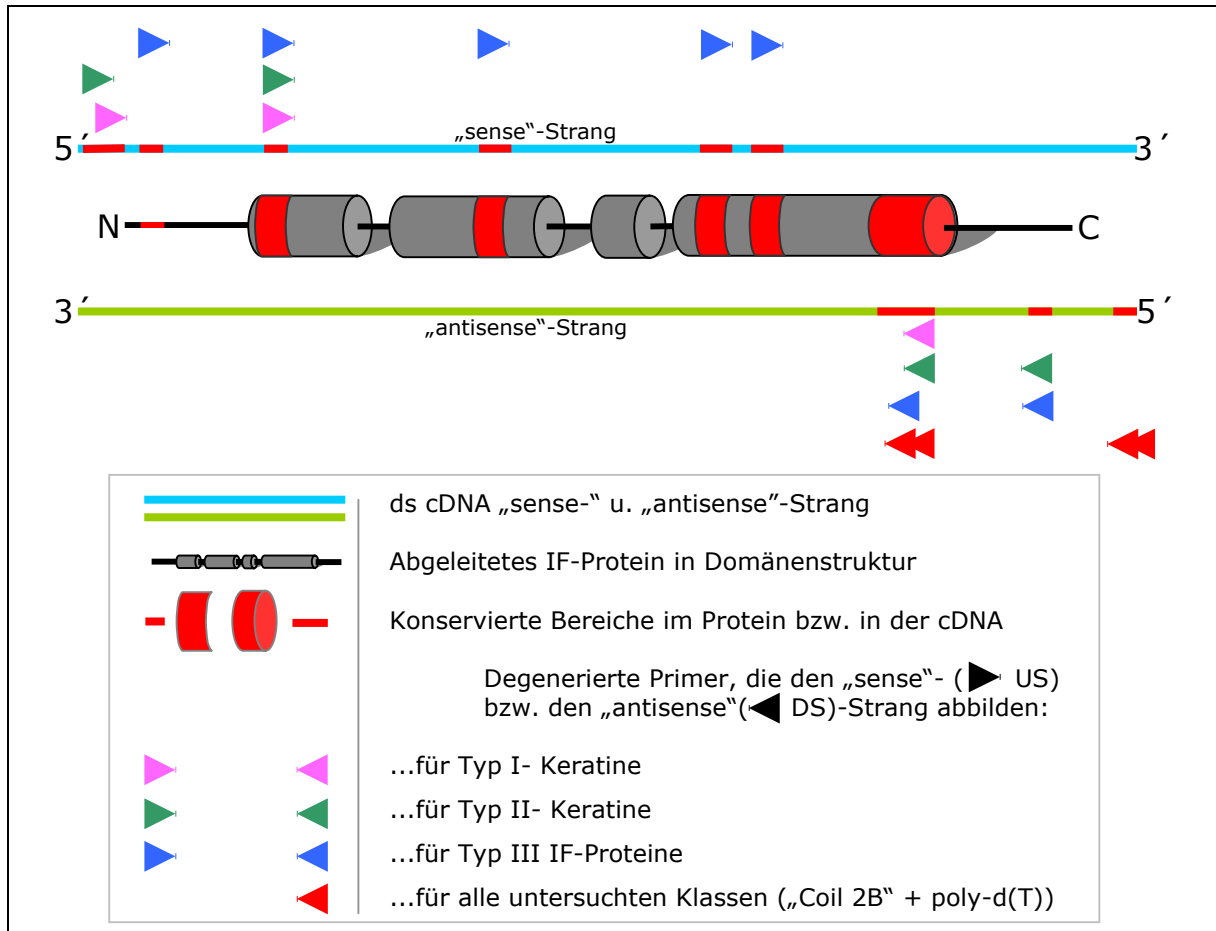


Abb. 12 Potentielle Primerbindungsstellen an konservierten Bereichen in der cDNA von IF-Proteinen. Die Primerbindungsstellen liegen teilweise außerhalb des codierenden Bereiches wie bspw. der Poly-d(T)-Linker-Primer (5'-Ende des „antisense“-Strangs). Die Sequenzen der wichtigsten Oligonukleotide für RT-PCR finden sich im Anhang unter F3.

Die vier cDNA-Banken, aus denen die Sequenzen gewonnen werden konnten, sind drei ZAP-Express[®]-cDNA-Banken und eine SMART[™]-cDNA-Bank und werden im folgenden mit ZI, ZII, ZIII, und SI abgekürzt. ZIII wurde aus Poly-A⁺-RNA von neuronalen Geweben, aber auch vom Saugmund und Ösophagus des Neunauges hergestellt, während ZI, ZII und SI cDNA-Klone enthalten, die aus der mRNA von Epidermis, Kieme, Muskel und Darmgewebe resultieren. Bei der Synthese von ZI und SI wurde zusätzlich RNA aus dem Auge mitverwendet.

Die cDNA-Banken SI, ZI und ZIII hatten jeweils einen Primärtiter von 3×10^5 pfu, die cDNA-Bank ZII hatte einen Primärtiter von über 4×10^6 pfu und lieferte die meisten der vollständigen für IF-Proteine codierenden cDNA-Klone. Isolierte Phagen aus der Bank SI beinhalteten dagegen kaum verwertbare Sequenzdaten.

Im folgenden werden die cDNA-Klone von *Lampetra fluviatilis* (*lfl*, *Lfl*) in Kleinbuchstaben und kursiv benannt (Bsp.: *lfl-k18*), die daraus abgeleiteten Proteinsequenzen dagegen nicht-kursiv und mit großen Anfangsbuchstaben (Bsp.: *Lfl-K18*). Genomischen Klonen wird ein „g-“ vorangestellt (Bsp.: *g-lfl-ka1*), Klone aus RT-PCR dagegen ein „p-“ (Bsp.: *p-lfl-d*). Die Accession-Nummern der EMBL-

Sequenzdatenbankeinträge der cDNA-Klone finden sich in Tab. 7 unter C6, die DNA-Sequenzen im Anhang unter F8.

2. Sequenzierung und Expression von Keratinen und keratinartigen Proteinen

Insgesamt konnten zwölf verschiedene cDNA Klone und ein genomischer Teilkлон identifiziert werden, die für Keratine bzw. keratinartige Sequenzen codieren. Die abgeleiteten Polypeptidsequenzen gliedern sich in drei Typ I-Keratine, vier Typ II-Keratine sowie sechs weitere keratinähnliche Proteine. Die sieben „echten“ Keratine können alle den biochemischen Proteinmustern aus Epidermis-, Kiemen-, Herz und Darmpräparationen vom Neunauge zugewiesen und weitgehend auch in „E“- und „S“-Keratine unterteilt werden. Von den fünf vollständigen keratinartigen Proteinsequenzen werden drei bestimmten Proteinflecken im 2D-PAGE der Cytoskelettpräparation der Epidermis zugeordnet.

2.1 cDNA-Klone, die für Typ I-Keratine codieren (Lfl-K10, Lfl-K11, Lfl-K18)

Mit zwei degenerierten Oligonukleotiden, die innerhalb der von anderen Arten bekannten Typ I-Keratinen konservierte Sequenzmotive am Anfang bzw. am Ende der helikalen Rod-Domäne abbilden (Primer: „Typ 1 rodstart“, „Typ I endrod“; siehe Abb. 12 und Anhang F2), wurden zwei verschiedene Fragmente in einer RT-PCR-Reaktion amplifiziert und anschließend in Plasmidvektoren kloniert. Als Template diente isolierte Poly-A⁺-mRNA des Flussneunauges. Die beiden entsprechenden Keratin-cDNA-Klone (bezeichnet als *lfl-k10* und *lfl-k18*) konnten dann durch DNA-Sondenscreening vollständig isoliert werden; interessanterweise wurden sie beide durch die Sonde des jeweilig anderen PCR-Fragments detektiert.

Ein dritter Typ I-Keratin-cDNA-Klon (*lfl-k11*) konnte ebenfalls durch das „Screenen“ mit der Sonde aus dem Klon *lfl-k18* gefunden werden. Der erste Klon war am 3'-Ende unvollständig; im weiteren Verlauf meiner Untersuchungen konnte aber sowohl mit einer Sonde aus dem *lfl-k11*-Fragment als auch mit dem Anti-Keratin-Antiserum GP_{poly} der vollständige Klon detektiert werden. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der drei Klone (Lfl-K10, Lfl-K11, Lfl-K18) zeigt Abb. 13, die DNA-Sequenzen finden sich im Anhang unter F 8.1.

Alle drei cDNA-Klone ließen sich nur unter größeren Schwierigkeiten im Bereich des 3'-UTR sequenzieren. Bei *lfl-k10* (2922 bp) tritt ein 576 Basenpaare langes Wiederholungsmotiv mit der Sequenz <CT (G/A) ATG (T/C) (T/A) G> auf, das durch einen Fehler bei der Reversen Transkription entstanden sein könnte: für Lfl-K10 codierende Klone wurden wiederholt und aus verschiedenen cDNA-Banken isoliert. Das Wiederholungsmotiv fängt bei allen sequenzierten Klonen an unterschiedlicher Position auf der 5'-Seite des „Sense“-Strangs an, beginnt jedoch immer an identischer Position auf der 3'-Seite. Zudem variiert die Nukleotidsequenz des Motivs bei den unterschiedlichen Klonen leicht. Nur bei einem Klon aus der cDNA-Bank Z II war die codierende Sequenz nicht davon betroffen und konnte von beiden Seiten bis zum Stopcodon sequenziert werden. Bei diesem Klon befindet sich zwischen Stopcodon und dem beschriebenen Wiederholungsmotiv eine weitere, etwas unregelmäßigere Wiederholungseinheit mit der häufig wiederkehrenden Sequenz <ATCACT> (327 bp, siehe Anhang F 8.1). Auffällig ist bei diesem Klon auch ein doppeltes Polyadenylierungssignal (<**AATAAA**AATAAA>) 34 Basenpaare vor dem Poly-A-Schwanz. Die aus der Tail-Domäne abgeleitete Aminosäuresequenz wurde durch MALDI-MS-Analyse verifiziert (siehe Anhang F 7.1).

Der 2398 bp lange Klon *lfl-k11* ließ sich aufgrund langer unregelmäßiger C/T-Wiederholungen im 3'-UTR nur in kleinen Schritten sequenzieren. Schwierigkeiten bereitete zudem die Auswahl weiterer Sequenzier-Primer durch die gleichförmige Abfolge der Nukleotide in diesem Bereich. Der 1098 bp lange 3'-UTR des Klons *lfl-k18* (2509 bp) schließlich konnte nicht vom 3'-Ende aufgrund eines 48 Basen langen Poly-A-Schwanz ansequenziert werden, auf der 5'-Seite verhinderte ein 23 bp langer Guanin-reicher Abschnitt im 3'-UTR die Sequenzierungsreaktion. Ein Oligonukleotid, welches den Beginn dieser G-reichen Sequenz abbildet, konnte nach wiederholten Versuchen die Sequenzierung des unbekanntes Bereiches initiieren.

Nur an zehn Aminosäurepositionen unterscheiden sich alle Sequenzen in der helikalen Rod-Domäne voneinander, an 247 Positionen sind dagegen alle drei identisch. Mit 90% Identität sind vor allem Lfl-K10 und Lfl-K18 innerhalb der Rod-Domäne sehr ähnlich. Lfl-K11 hat in diesem Bereich an 33 Positionen Aminosäuren, die von den beiden anderen Sequenzen abweichen und jeweils 83% Identität zu den beiden anderen Typ I-Keratinen (Modell: p-distance, ohne Berücksichtigung von Rückmutationen, max. Standardabweichung: 2,0%).

Die Unterschiede der Typ I-Keratine werden hauptsächlich durch die Länge der Tail-Domänen bestimmt. Das abgeleitete Protein Lfl-K10 ist mit 531 Aminosäuren und einer theoretischen Molekülmasse von 56,2 kDa das größte und basischste Typ I-Keratin des Neunauges (pI: pH 5,48); Lfl-K11 weist eine errechnete Masse von 50,9 kDa und einen pI bei pH 5,43 bei 482 Aminosäuren auf. Das kleinste Typ I-Keratin (Lfl-K18) hat eine nur aus zwölf Aminosäuren bestehende Tail-Domäne und auch die Head-Domäne ist ca. 20 Aminosäuren kürzer als die der beiden anderen Typ I-Keratine. Das resultierende Protein ist 382 Aminosäuren lang, hat eine Masse von 42 614 Da und den am weitesten im sauren Bereich liegenden isoelektrischen Punkt (pH 5,16).

2.2 cDNA-Klone, die für Typ II-Keratine codieren (Lfl-K1, Lfl-K2, Lfl-K3, Lfl-K8)

Sowohl der Antikörper IFA, als auch das Anti-Keratin-Antiserum GP_{poly} markierten im Rahmen von cDNA-Screenings den vollständigen Klon einer für ein Typ II-Keratin codierenden cDNA (*lfl-k1*). GP_{poly} „erkannte“ einen weiteren vollständigen, für ein Typ II-Keratin codierenden cDNA-Klon (*lfl-k8*).

Des Weiteren konnte ein 0,7 kb großes Fragment einer für ein Typ II-Keratin codierenden cDNA in einer 5'-RACE mit den Primern „AAP“ und „Id-endrod“ (siehe F2) amplifiziert werden. Diese Sequenz wurde durch cDNA-Bank-Screening zwar verlängert (*lfl-k2*, 1,8 kb), dem Klon fehlt jedoch der nicht-codierende 5'-flankierende Bereich, sowie ein Teil der für die Head-Domäne codierenden Sequenz. Screenings der cDNA-Banken, sowie weitere 5'-RACE-Reaktionen konnten zwar immer wieder Teilsequenzen von *lfl-k2* detektieren, die Sonde und die Primer aus der bekannten Sequenz lieferten jedoch weitaus häufiger Klone bzw. Fragmente, die für andere Typ II-Keratine des Flussneunauges codieren (Kreuzhybridisierung).

Der cDNA-Klon *lfl-k3* codiert für ein viertes „echtes“ Typ II-Keratin von *Lampetra fluviatilis*. Ein Fragment seiner codierenden Sequenz wurde zuerst durch eine 5'-RACE gewonnen, bei der nicht, wie vorgesehen, der RACE-Upstream-Primer AAP am Antisense-Strang gebunden wurde, sondern der „Downstream“-Primer auf beiden Seiten die Amplifizierung initiierte. Zudem war dieser Primer spezifisch für einen anderen keratin-ähnlichen Klon (*lfl-ka2*, siehe C 2.2). Der cDNA-Klon *lfl-k3* konnte durch Sondenscreening vervollständigt werden. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der vier Klone (Lfl-K1, Lfl-K2, Lfl-K3, Lfl-K8) zeigt Abb. 14, die DNA-Sequenzen finden sich im Anhang unter F 8.2.

Typ II-Keratine des Neunauges <i>Lampetra fluviatilis</i>		
Lf1-K1	MSYSIKSSGVSSVSRSRSSGGSSIRIGGGGGGGRSGGFSSHSQFGGGGGGSRSRSSYKSG	60
Lf1-K3	MA-----STRSTTVRSSSTRISVGGSGG--SRGFSSASLSAGGRSAGR--KSGLS--	47
Lf1-K2	-----<FSRRSTALGGSSYRAG-----SAASSFGYG-----	25
Lf1-K8	MS-----LRNRGFSSKSVVTG-----GSLKGARSSIRYD-----	29
	* . . . *	
Lf1-K1	GSSYGGGGGGFGGISASF--SSQVAAGPPPEIDRSILPVRNQEKDQIKGLNDRFANFIDK	119
Lf1-K3	-ASYRSGGGG-FGGFSAS--SAAMLSPPEIDRSVLPVRTQEKDQIKGLNDRFANFIDK	103
Lf1-K2	--SYGSGGYG--GGVGAASAAAMACAAPVDIDRSVLPTRTQEKDAIKHLNDRFANFIDK	81
Lf1-K8	-----GRASRSSAGVLTGAPPPEIDRSVQDVRSQEKDQIRGLNDRFANFIDK	77
	* . : . . . * :****: .*.***: * : *****	
Lf1-K1	VRFLEQQNKVLEAQWRALQERGSNGSLDLSFEAYINGLKQHLDGLGNEKQRLQVELQHM	179
Lf1-K3	VRFLEQQNKVLEAQWRALHERGTVVSGLDGLFDAYTRGLKQQLESLSNNKLGQLNELQAM	163
Lf1-K2	VRFLEQQNKVLEAQWYALQEKTTTSSVDEMFEAYINGLRRQLDGLGHDKGQLNGNLGQM	141
Lf1-K8	VRSLEQQRSVLEAQWKVLQAKGDDKSNLEDIYQEYIRGLRRQLEVLQENKEHLQSDVGHM	137
	** ****.***** .*: : *.: : : * .*: : : * .*: : * : : *	
Lf1-K1	QGAVEDFKAKYEEEINTRTQRENEFVVVKKEVDDAFLNKVELEARLDGLNDEIEFLKKIF	239
Lf1-K3	QGHVEDFKTKYEEEINTRTERENEFVVVKDQVDDAFLNKVELEAKLEALQDEIEFLKKIF	223
Lf1-K2	QAVVEDFRAKYETEINNRNAAEGEFVVVKDQVDGAYLSKVELETRLQGLVDEINFLRSIF	201
Lf1-K8	QGVVEEFKNKYETELNRRNHAENEFVLIKKDFDDAHLNKVELEARLEGLTDEIDFLRRIY	197
	*. ***: : *** *:.*. * .***: : ** : .*. * .*****: : .*. * ***: : ** : *	
Lf1-K1	AEELRQLESQIKDTSLFVSVDTSRNLDVDGLIADVRAQYEAMARKSQAEADDFYKKKITE	299
Lf1-K3	TEELRQLESQIQDTILTVEIDTSRNLDVDGLIADVRAQYEAIAAKSKAESDAFYRSKFAD	283
Lf1-K2	TQELSELEAQIKHTNVLVEIDNSRNLDIDGIIADVRHQYETIAARSRAEADAFYQDKFQS	261
Lf1-K8	EEELRELHAQMNNISLTVVVDTRNRFNMDDIVASVRSQYEAALQQSRQAEADFYKVKFED	257
	: ** :*. :*: : . : *.: *.: : : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *	
Lf1-K1	LSSSAGKGGDDVNRNRNEINELNRQMQRKAEIEALKKQRAQLEAAISEAEGRGEMSIKE	359
Lf1-K3	LNAMSGKGGDDLQRSRSEIADINRQVQRKAEIEALKKQRAQLEAAIAEAEGRGELAIKE	343
Lf1-K2	LHSDSGRNDEELRMTKTEITELNRQMQRFRAMEALKKQRAKLESAIAEAEGRGEADIRE	321
Lf1-K8	INASADKSNEDIRNSKQELNDLLRTIKSLTSEVQRLKQQRGQAEERAVAEGEDLGEQAVKD	317
	: : : : : : * : : * : : * : : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Lf1-K1	AKETIARLEEEELHKAQKQMAQHVRVREYQELMNVKLALDIEIATYRKLLEGEESRLNAVASG	419
Lf1-K3	AKESIARLEEEELHQAQKQDMAKHVHEYQELMNVKLALDIEIATYRKLLEGEESRLQNVTAG	403
Lf1-K2	AKAAIAQLEEEIHKAKQEMARHVREYQELMNVKLALDIEIVTYRKLLEGEESRLNVITQH	381
Lf1-K8	AKQRIADLEQELADSRQMAQHVRDYQELMNVKLALDIEIATYKLLLEGEEDRLSSLAGA	377
	** ** ***: : : : : ***: : : *****. ** *****. ** . : :	
Lf1-K1	IANLAGAMSGGGGGGGHG-FSSGGGGGGGSSYGFSSGGGGGGGSGFSYESSMSKRSY	478
Lf1-K3	MANLG-----GMGGYGG--YSVST-----SYETS---SKRSY	430
Lf1-K2	ITQSGGQLHSQGGSSFGGDMMCSLGGGSHSGSVSYSGG-----SYSQMSSGSIKMST	436
Lf1-K8	RGRNPRN-----YSYSFGDDDLTSHYESAIPRSSKTVIKSIETQDGSVLSET	425
	. * . . * * : .	
Lf1-K1	-----	
Lf1-K3	-----	
Lf1-K2	HY--- 438	
Lf1-K8	TEVRN 430	

Abb. 14 Abgeleitete Aminosäuresequenzen der für Typ II-Keratine codierenden cDNA-Klone *lf1-k1*, *lf1-k3*, *lf1-k2* und *lf1-k8* im Alignment (ClustalX, multiple sequence alignment). In den Aminosäuresequenzen sind - wie in der Einleitung erläutert - die typischen IF-Proteindomänen nach Conway und Parry (1988) farblich unterschiedlich hervorgehoben. Sterne (*), Doppelpunkte (:) und einfache Punkte (.) unter den Sequenzen zeigen verschiedene Konservierungsgrade der Aminosäuren an. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons *lf1-k2* ist auf der N-terminalen Seite des Proteins unvollständig (<).

Die cDNA-Klone *lfl-k3* (3001 Basenpaare) und *lfl-k8* (2696 bp) haben jeweils einen relativ langen 3'-UTR, der im Falle von *lfl-k3* sogar die Länge des größten ORF übersteigt (3'-UTR: 1496 bp, ORF: 1290 bp). Dem ebenfalls 1290 bp langen ORF von *lfl-k8* schließt sich ein 1182 bp langer 3'-UTR an. Auffällig ist auch im 3'-UTR von *lfl-k3* das 33 bp vor dem Poly-A-Schwanz liegende, verlängerte Polyadenylierungssignal <AAATAATAAAA>, während der Klon *lfl-k2* (1857 bp) kein echtes Polyadenylierungssignal besitzt, sondern nur einen adeninreichen Abschnitt 17 Basenpaare vor dem Poly-A-Schwanz. Diese Sequenz wurde durch Klone aus verschiedenen cDNA-Banken (ZI und Z II) verifiziert.

Mit 478 abgeleiteten Aminosäuren beinhaltet der insgesamt nur 1901 bp lange cDNA-Klon *lfl-k1* den größten ORF der vier Typ II-Keratinklone (theoretische Molekülmasse: 51,1 kDa). Die Position des Proteins Lfl-K2 in der 2D-PAGE (vgl. C5) deutet jedoch darauf hin, dass dieses Protein das größte Typ II-Keratin von *Lampetra* ist. Das vom Klon *lfl-k2* abgeleitete Proteinfragment ist acht Aminosäuren länger als Lfl-K3 und Lfl-K8 und mit einer errechneten Molekülmasse von 48,2 kDa ähnlich groß (Lfl-K3: 47,4 kDa; Lfl-K8: 49,2 kDa). Die theoretischen Werte für die isoelektrischen Punkte der abgeleiteten Proteine liegen in einem Bereich von pH 5,16 (Lfl-K8) bis 5,91 (Lfl-K1). Das vollständige Protein Lfl-K2 hat (anhand von 2D-PAGE und MALDI-MS-Analyse, vgl. Abb. 23 wahrscheinlich einen basischeren pI-Wert als der des vom cDNA-Klon abgeleiteten Fragments (pH: 5,46). Lfl-K3 liegt rechnerisch bei pH 5,43 als Zwitterion vor.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Klone *lfl-k1* und *lfl-k3* sind sich am ähnlichsten (76% Identität), während Lfl-K8 zu den anderen Typ II-Keratinen des Neunauges nur zu 48%-52% identische Aminosäurepositionen aufweist. Dies wird nicht nur durch die relativ Glycin-armen Head- und Tail-Domänen deutlich, sondern auch durch viele abweichende Positionen innerhalb der Rod-Domäne. Das Proteinfragment Lfl-K2 hat 63% bzw. 62% Ähnlichkeit zu Lfl-K1 und Lfl-K3 (Modell: p-distance, ohne Berücksichtigung von Rückmutationen, max. Standardabweichung: 2,4%).

2.3 cDNA-Klone, die für α - und γ -Keratine codieren

Der wie die Neunaugen zu den Cyclostomaten gehörende Schleimaal *Eptatretus stouti* exprimiert zwei IF-Proteine (Est-K α , Est-K γ), die große heterodimere Filamente bilden, die als sehr lange „Fäden“ Bestandteil des extrazellulär abgesonderten Schleims sind. Obwohl die obligate Heterodimerbildung diese IF-Proteine als Keratin-ähnlich charakterisiert, ist ihre Verwandtschaft anhand der Aminosäuresequenz zu den Keratinen nicht wesentlich näher als zu den anderen IF-Protein-Klassen (Koch et al., 1994; 1995). Von *Lampetra fluviatilis* konnten fünf cDNA-Klone und ein genomischer Teilklon sequenziert werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen diesen speziellen IF-Proteinen ähnlich sind. Zwei cDNA-Klone sowie der genomische Klon codieren für IF-Proteine des α -Typs, drei cDNA-Klone enthalten codierende Sequenzen für γ -IF-Proteine.

- **Keratine des α -Typs (Lfl-K α 1, Lfl-K α 2)**

Eine PCR mit genomischer DNA als Matrize, die mit degenerierten Primern durchgeführt wurde (Typ III-Primer: „endrod“ und „des“; siehe Anhang F2) amplifizierte zwei verschiedene DNA-Fragmente (*g-lfl-ka1* und *g-lfl-ka2*; *g* = genomisch), die von beiden Seiten ansequenziert wurden. Die Genfragmente erstrecken sich über jeweils zwei Introns, vermutlich ein dazwischen liegendes Exon und zwei Teilbereiche der flankierenden Exons, an die die Primer hybridisierten. Die sich in ihrer Sequenz sehr ähnlichen Exonfragmente auf der 3'-Seite der Klone codieren jeweils für 26 Aminosäuren, die das Ende der helikalen Rod (Coil 2B) innerhalb der IF-Proteine bilden. Die Position der Intron-Exon-Übergänge, die später anhand der cDNA-Sequenzen bestimmt werden konnte, sind bei beiden Fragmenten an exakt dergleichen Position und zeigen nur teilweise Übereinstimmung mit Genstrukturen bekannter IF-Protein-Gene (Johnson et al., 1985; Marchuk et al., 1985; Ferrari et al., 1986; Julien et al., 1987; Myers et al., 1987; Bader et al., 1988; Rieger und Franke, 1988; Kulesh und Oshima, 1989; Li et al., 1989; Krauss und Franke, 1990; Lin und Worman, 1995; Lendahl et al., 1990).

Die codierenden Sequenzen konnten durch PCR aus cDNA und Sondenscreening vervollständigt werden (cDNA-Klone *lfl-ka1* und *lfl-ka2*). Die Bezifferung der Klone erfolgte in der Reihenfolge ihrer Entdeckung. Die Nukleotidsequenzen finden sich im Anhang unter F 8.3; die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigt Abb. 15.

Während eines Versuchs *lfl-ka2* mit Sondenscreening zu vervollständigen, wurde vermutlich durch DNA-Verunreinigung in der mRNA, ein genomischer Klon (*g-lfl-ka3*) aus der cDNA-Bank Z I isoliert und von beiden Seiten ansequenziert. Er weist an identischer Position wie die PCR-Produkte *g-lfl-ka1* und *g-lfl-ka2* im Bereich der Coil 2B einen Intron-Exon-Übergang auf und ist diesen bezüglich der aus dem Exon abgeleiteten Aminosäuresequenz sehr ähnlich. Ein weiteres Exon dieses Klons codiert wahrscheinlich für die komplette Tail-Domäne (Abb. 15). Ein „echter“ cDNA-Klon, der entsprechende Sequenzen beinhaltet, konnte aus den cDNA-Banken oder durch RT-PCR nicht detektiert werden, so dass es noch ungeklärt ist, ob das Gen von *Lampetra fluviatilis* transkribiert und das Protein exprimiert wird. Die DNA-Sequenz von *g-lfl-ka3* findet sich im Anhang unter F 8.3.

Die mit einer Molekülmasse von errechneten 63 kDa bzw. 67 kDa großen IF-Proteine Lfl-K α 1 und Lfl-K α 2 werden von 2834 bp bzw. 2779 bp großen cDNA-Klonen codiert. Die Größe wird vor allem durch überproportional lange Head- und Tail-Domänen bestimmt, die im Falle von Lfl-K α 1 zusammen nahezu so lang wie die gesamte Rod-Domäne sind (310 zu 317 Aminosäuren) oder diese wie bei Lfl-K α 2 noch an Zahl der Aminosäuren übertreffen (359 zu 316 Aminosäuren).

In der Head-Domäne der beiden Proteinsequenzen befindet sich ein Consensusmotiv mit der Sequenz <SVRYG> elf bzw. zehn Aminosäuren hinter dem ersten Methionin (siehe Abb. 15, blauer Kasten). Innerhalb der Rod-Domäne sind ebenfalls Abschnitte von großer Ähnlichkeit zwischen den beiden IF-Proteinen vorhanden. Dabei fallen besonders identische Bereiche von 14 Aminosäuren (Coil 1A) und 18 Aminosäuren (Coil 2B) auf. Der Linker L12 ist mit 22 bzw. 21 Aminosäuren fünf bzw. vier Aminosäuren länger als bei „echten“ Keratinen, der Linker L1 ist um jeweils eine Aminosäure verlängert. Die Identität der Proteine über die gesamte Länge beträgt 52,4% (Modell: p-distance ohne Berücksichtigung von Rückmutationen, max. Standardabweichung: 2,1%).

Der theoretische pI von Lfl-K α 2 liegt, im Vergleich zu anderen IF-Proteinen mit pH 8,80 sehr weit im basischen Bereich, bei Lfl-K α 1 liegt er bei pH 5,77.

- **Keratine des γ -Typs (Lfl-K γ 1, Lfl-K γ 2, Lfl-K γ 3)**

Drei weitere vollständige cDNA-Klone konnten isoliert werden, deren entsprechende Proteinsequenzen nach Datenbankvergleichen noch vor Ähnlichkeiten zu anderen IF-Klassen die größten Gemeinsamkeiten mit dem γ -keratinartigen Protein des Schleimaals *Eptatretus stouti* aufweisen (Abb. 16). Diese cDNA-Klone des Neunauges werden deswegen – analog zu den Proteinen des α -Typs – in der Reihenfolge ihrer Detektion als *lfl-ky1*, *lfl-ky2* und *lfl-ky3* bezeichnet.

Ein 464 bp großes PCR-Fragment des Klons *lfl-ky1* konnte im Rahmen einer 5'-RACE isoliert werden. Die Amplifizierungsreaktion erfolgte mit einem spezifischen Downstream-Primer aus der Sequenz von *g-lfl-ka1* (siehe oben). Dieser hybridisierte nicht nur mit dem Sense-Strang der cDNA, sondern auch - anstelle des eigentlich dafür vorgesehenen RACE-Primers AAP - mit dem Antisense-Strang. In mehreren cDNA-Screenings mit diesem PCR-Produkt als DNA-Sonde konnte die cDNA-Sequenz vervollständigt werden.

Durch kombiniertes Screening der cDNA-Bank mit dem Antikörper DE-B-5, der in Immunblots das Typ III-IF-Protein Desmin von *Lampetra fluviatilis* detektiert und einer Sonde, die die codierende Sequenz der des Vimentins der Regenbogenforelle *Onchorynchus mykiss* repräsentiert (Herrmann et al., 1996b), konnte der vollständige Klon *lfl-ky2* isoliert werden. Mit derselben Sonde wurde in einem weiteren Screening der komplette cDNA-Klon von *lfl-ky3* detektiert.

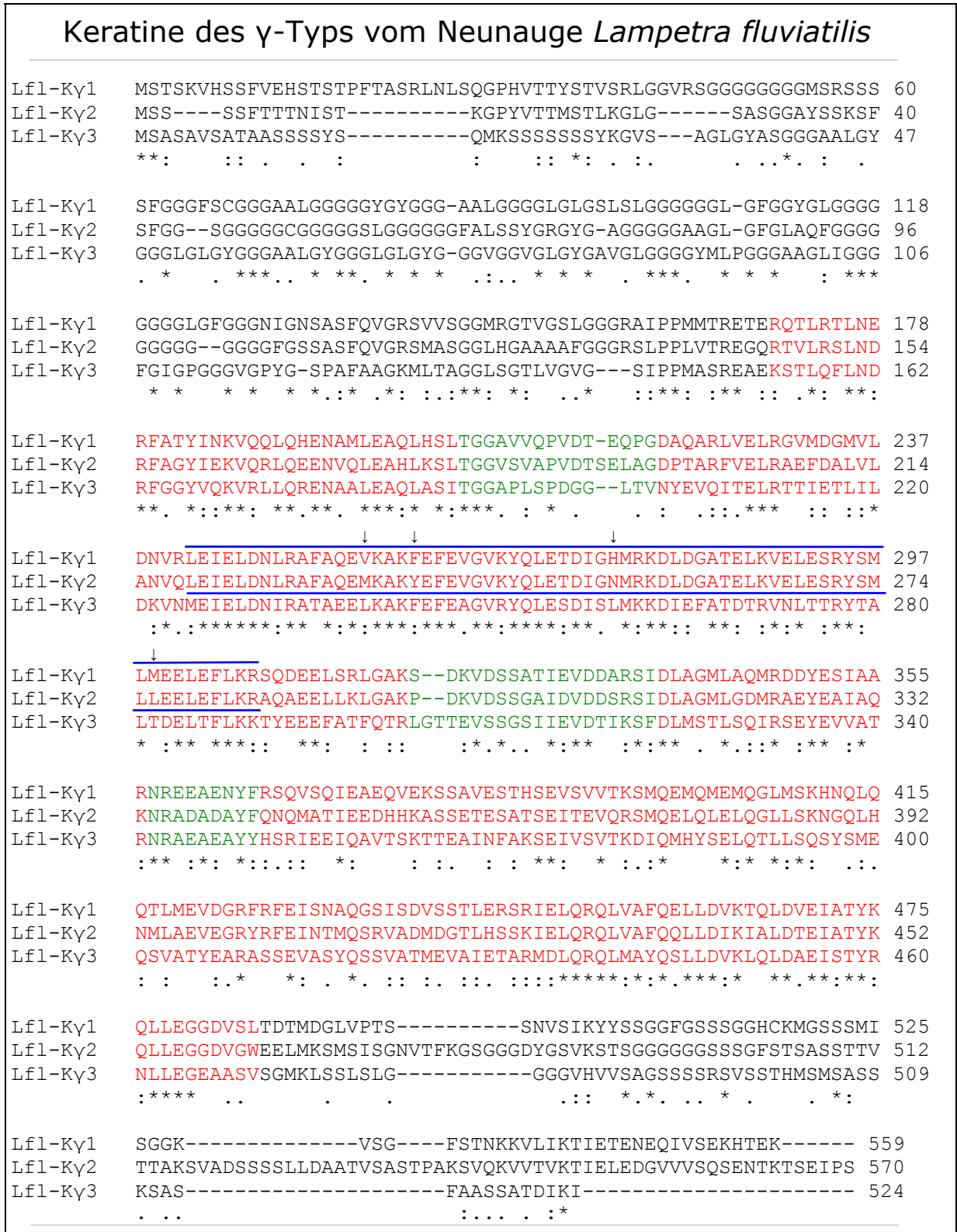


Abb. 16 Abgeleitete Aminosäuresequenzen der für γ -keratinartige Proteine codierenden cDNA-Klone *lfl-k γ 1*, *lfl-k γ 2* und *lfl-k γ 3* im Alignment (ClustalX, multiple sequence alignment). In den Aminosäuresequenzen sind - wie in der Einleitung erläutert - die typischen IF-Proteindomänen nach Conway und Parry (1988) farblich unterschiedlich hervorgehoben. Sterne (*), Doppelpunkte (:) und einfache Punkte (.) unter den Sequenzen zeigen verschiedene Konservierungsgrade der Aminosäuren an. Die **blauen** Linien weisen auf einen stark konservierten Abschnitt innerhalb Lfl-K γ 1 und Lfl-K γ 2 hin, die Pfeile (↓) auf die wenigen Aminosäureaustausche in diesem Bereich.

Die cDNA-Klone *lfl-kγ1* und *lfl-kγ2* haben jeweils relativ kurze untranslatierte Bereiche, die die codierende Sequenz flankieren (5'-UTR: 81 bp bzw. 77 bp; 3'-UTR: 234 bp bzw. 262 bp). Mit 2012 bp bzw. 2068 bp insgesamt sind die Klone auch ungefähr gleich groß. Die abgeleiteten Polypeptide der beiden cDNA-Klone haben nicht nur exakt denselben Wert für den isoelektrischen Punkt (pH 5,20), sondern auch annähernd die gleiche Molekülmasse von 58 996 Da (Lfl-Kγ1) bzw. 58 991 Da (Lfl-Kγ2). Das 559 Aminosäuren zählende Lfl-Kγ1 hat mit 169 Aminosäuren eine sehr lange und um 24 Aminosäuren größere Head-Domäne als Lfl-Kγ2 (insgesamt 570 Aminosäuren), dessen Tail-Domäne dafür 34 Aminosäuren länger als bei Lfl-Kγ1 ist. Im Coil 1B der Rod-Domäne liegt ein 66 Aminosäuren umfassender Bereich, innerhalb dessen sich beide Sequenzen an nur vier Aminosäurepositionen unterscheiden (Abb. 16, blaue Linien, kleine Pfeile).

Obschon in diesem Abschnitt auch der cDNA-Klon *lfl-kγ3* bzw. sein abgeleitetes Polypeptid hohe Übereinstimmungen mit den beiden anderen γ-Keratin-Klonen des Neunauges aufweist, unterscheidet er sich jedoch insgesamt mehr von ihnen. Während der Klon selbst größer ist (2365 Basenpaare), codiert der längste ORF in der cDNA für ein kleineres Protein aufgrund einer kürzeren Tail-Domäne (insgesamt 524 Aminosäuren, 54253 Da). Die Linkerregion L12 ist zwei Aminosäuren länger und der errechnete pI (pH 4,97) liegt etwas weiter im sauren Bereich als der von Lfl-Kγ1 und Lfl-Kγ2. Der berechnete Unterschied von Lfl-Kγ3 zu Lfl-Kγ1 und Lfl-Kγ2 beträgt ca. 59 bzw. 62 Prozent, während diese untereinander nur um 40% differieren (Modell: p-distance ohne Berücksichtigung von Rückmutationen, Standardabweichung: 2,0%).

2.4 Expressionsmuster der Keratine von *Lampetra fluviatilis*

Der Complementäre Keratin Blotbindungs-Test (CKBB-Test) gibt Aufschluss darüber, ob in Geweben Keratine exprimiert werden und mit welchem Typ sie heteropolymerisieren. Aus den Ergebnissen von Brauer (1993) war bekannt, dass Keratine beim Flussneunauge bis auf wenige Ausnahmen (Endomysium, Blutgefäßendothel und Astrocyten) weitgehend auf Epithelien beschränkt sind. Antikörperreaktionen in der Immunfluoreszenzmikroskopie im Saugmundbereich wiesen Unterschiede gegenüber der Epidermis des Körpers auf. Deshalb wurden Cytoskelettpräparationen mit mehrschichtigen Epithelien (Epidermis, Saugmund) für die Identifizierung von „E“-Keratinen und solche mit einfachen Epithelien (Darm) zur Identifizierung der „S“-Keratine in einer zweidimensionalen PAGE aufgetrennt. In der Kieme des Agnathen, die ein- und mehrschichtige Epithelien enthält, werden sowohl „E“- als auch „S“-Keratine exprimiert.

Die Abb.17 zeigt die Ergebnisse des CKBB-Tests der untersuchten Organe. Es lassen sich jeweils Typ I- und Typ II-Kandidaten nachweisen. Die positiv reagierenden Proteinflecke aus unterschiedlichen Geweben traten teilweise an vergleichbaren Positionen im Gel bzw. Blot auf. Es dürfte sich dabei um Keratinkandidaten handeln, deren Expression nicht nur auf ein Organ beschränkt ist.

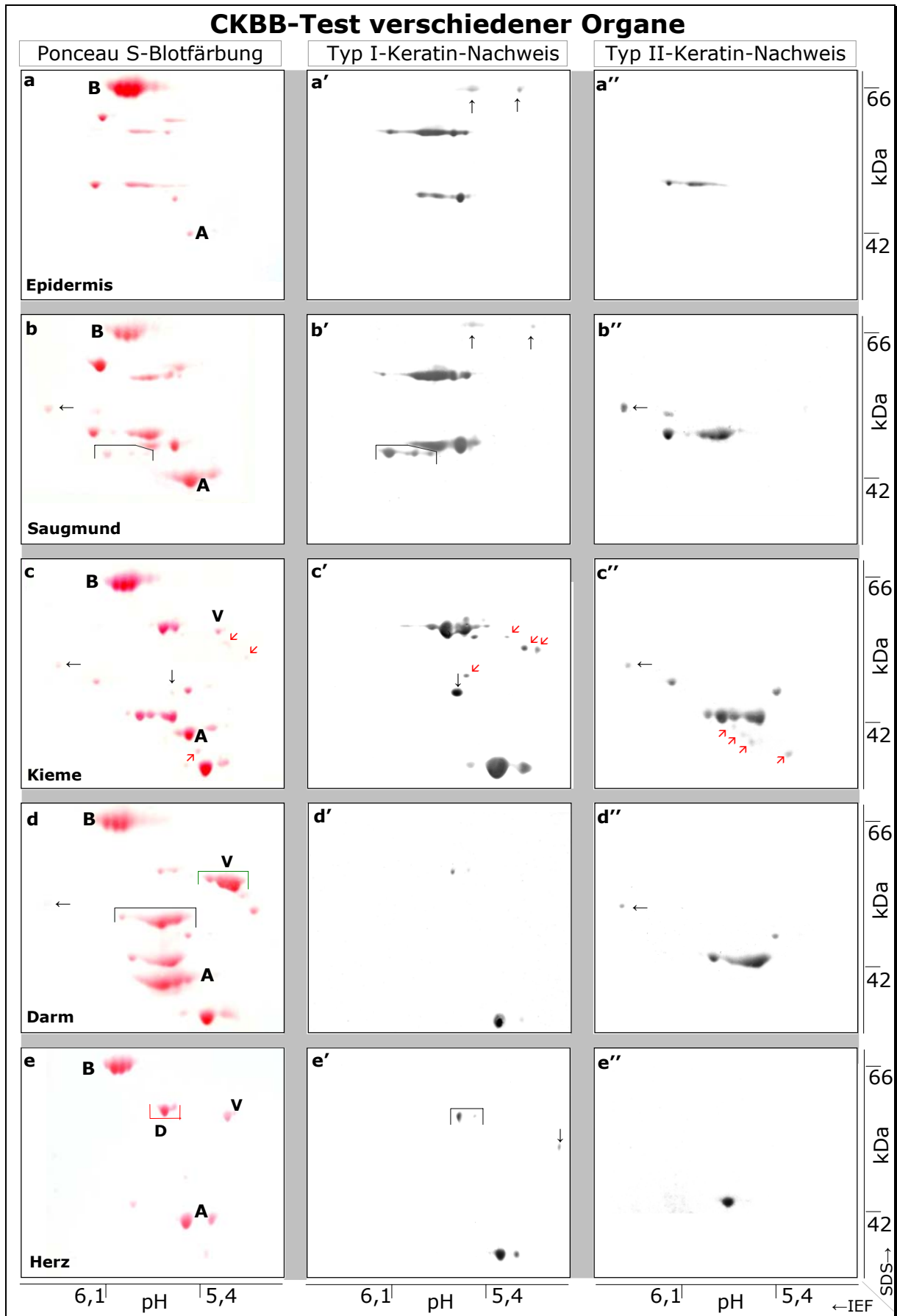


Abb. 17 CKBB-Test. Legende: siehe nächste Seite.

Abb.17 Biochemischer Keratin-Nachweis durch Complementären Keratin-Blotbindungs-Test (CKBB-Test): Zweidimensionale PAGE (1. Dimension: isoelektrische Fokussierung, (IEF); 2. Dimension: SDS-PAGE) von Proteinen nach IF-Präparation verschiedener Gewebe (in Zeilen: Epidermis (a), Saugmund (b), Kieme (c), Darm (d) und Herz (e)), sowie Nachweis der Keratine durch den CKBB. **1. Spalte a-e:** Ponceau S-Färbung der Blots; Markerproteine BSA (B) und Aktin (A), Potentielle Kandidaten für Desmin (D, rote Klammer) und Vimentin (V, grüne Klammer). **2. Spalte a'-e':** CKBB mit biotinyliertem, menschlichen Keratin K8, zur Identifizierung der Typ I-Keratine. **3. Spalte a''-e'':** CKBB mit biotinyliertem, menschlichen Keratin K18, um die Typ II-Keratine zu identifizieren. Schwarze Pfeile markieren schwache oder nicht eindeutige Reaktionen, rote diagonale Pfeile deuten auf mögliche Keratinabbauprodukte hin.

Die Markierung der Keratine in Epidermis, Saugmund und Kieme entspricht bezüglich der dominanten Proteinflecke den Untersuchungen von Brauer (1993). Im Test zur Identifizierung der Typ I-Keratine in der Epidermis und im Saugmund wurden zwei zusätzliche Flecke identifiziert (Abb.17 a' und b', vertikale schwarze Pfeile), die durch Ponceau S nicht bzw. so schwach gefärbt wurden, dass sie in der Abbildung nicht zu sehen sind (Abb.17 a und b). Diese Flecke traten nicht in jeder Präparation der Epidermis auf (vgl. C5). In den Epithelien des Saugmunds wurden im Vergleich zur Epidermis je ein weiterer Typ I- und Typ II-Kandidat markiert (Abb.17 b, b' und b'', horizontaler schwarzer Pfeil, schwarze Klammer). Bei Brauer (1993) traten im CKBB aus Zungengewebe an ähnlichen Positionen Keratinkandidaten auf.

In der Mitte des Blots der Kiemenpräparation wird ebenfalls ein zusätzliches Typ I-Keratin beobachtet, welches in der Ponceau S- Färbung nur schwach zu erkennen ist (Abb.17 c und c', kleiner senkrechter schwarzer Pfeil). In dessen Nähe reagierte schwach ein weiterer Proteinfleck, der in der Ponceau S-Färbung gar nicht auftrat. Möglicherweise ist dieser, ebenso wie mehrere kleine Flecken auf der rechten Seite, ein Abbauprodukt des größten Typ I-Keratins in der oberen Bildmitte (Abb.17 c und c', kleine diagonale rote Pfeile). Auch bei der Detektion der Typ II-Keratine auf dem Kiemenblot trat schwach ein Typ II-Kandidat auf, der bei Brauer (1993) nicht in der Kieme detektiert wurde (Abb.17 c und c'', horizontaler schwarzer Pfeil). In der unteren Blothälfte ist eine Abbauproduktreihe eines Typ II-Keratins zu erkennen (Abb.17 c und c'', kleine diagonale rote Pfeile).

Darm und Herz wurden hier zum ersten Mal mittels CKBB-Test analysiert. Auffällig ist beim Ponceau S-gefärbten Blot des Darmgels die kräftige Proteinreihe in der Bildmitte, die in beiden Nachweisen negativ reagierte (Abb.17 d, schwarze Klammer). Das basischste der detektierten Typ II-Keratine aus Darmgewebe ist in der Ponceau S-Färbung kaum erkennbar (Abb.17 d und d'' kleiner waagrechter schwarzer Pfeil).

An der Position des potentiellen Desminkandidaten im Blot der Herz-Cytoskelettpräparation (Abb.17 e, rote Klammer, vgl. Abb. 23 b u. C 3.2) reagierte ein Typ I-Keratinkandidat positiv (Abb.17 e', schwarze Klammer), der schwarze senkrechte Pfeil in e' markiert ein schwach positiven Fleck, der vermutlich auf Verunreinigung mit humanem Keratin 9 zurückzuführen ist. Insgesamt reagierten drei Keratinkandidaten (zwei Typ I und ein Typ II) auf dem Herzblot eindeutig positiv. Sie werden vermutlich im Coelommesothel oder im Blutgefäßendothel des Herzens exprimiert.

3. Sequenzierung und Expression der Typ III-IF-Proteine Vimentin und Desmin

Ein vollständiger, für das Typ III Intermediärfilament-Protein Vimentin codierender cDNA-Klon konnte wiederholt aus mehreren cDNA-Banken isoliert werden. Das Protein wurde massenspektrometrisch identifiziert und immunologisch sowie immunfluoreszenzmikroskopisch charakterisiert.

Im Unterschied dazu konnte kein für das Typ III-IF-Protein Desmin codierender cDNA-Klon aus den cDNA-Banken isoliert werden. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie fielen ebenfalls negativ aus. Dagegen konnte ein Desminkandidat in Immunblots aus Muskel-Cytoskelettpräparationen mit mehreren Antikörpern identifiziert werden. Seine MALDI-MS-Daten erlaubten eine eindeutige Zuordnung der abgeleiteten und zusammengesetzten Sequenz mehrerer überlappender Teilkclone aus RT-PCR-Versuchen.

3.1 Für Vimentin und Desmin codierende cDNA-Klone

Der Antikörper IFA, der viele verschiedene IF-Proteine markiert (Pruss et al., 1981), detektierte beim cDNA-Screening einen Phagenklon, dessen cDNA für ein Typ III-IF-Protein codiert (*lfl-v*). Zunächst wurde er aufgrund seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz für Desmin gehalten; schon bald wurde jedoch durch weitere biochemische Analysen und „Peptide Mass Mapping“ deutlich, dass dieser Klon für Flussneunaugen-Vimentin (*Lfl-V*) codiert.

Ein 524 Basenpaare großes Fragment der für Flussneunaugen-Desmin codierenden mRNA wurde in einer RT-PCR mit Gesamt-RNA aus Muskelgewebe isoliert (PCR-Klon: *p-lfl-dl*). Die degenerierten Primer hierfür („maldides2“ und „desmaldi-rc“) wurden von tryptischen Oligopeptiden aus Desminsequenzen von Mensch, Rind, Ratte u.a. abgeleitet. Der theoretische Verdau dieser Desmine lieferte in fünf Fällen nahezu identische Massenwerte wie die MALDI-MS-Daten des biochemisch identifizierten Desminflecks des Flussneunauges, so dass auf mögliche konservierte Bereiche rückgeschlossen werden konnte (Programm: „PeptIdent“, Internet, siehe Anhang F9; Wilkins und Williams, 1997). Aus zwei der hypothetisch übereinstimmenden Fragmenten wurden die entsprechenden degenerierten Oligonukleotide abgeleitet und in der RT-PCR eingesetzt (siehe Abb. 18).

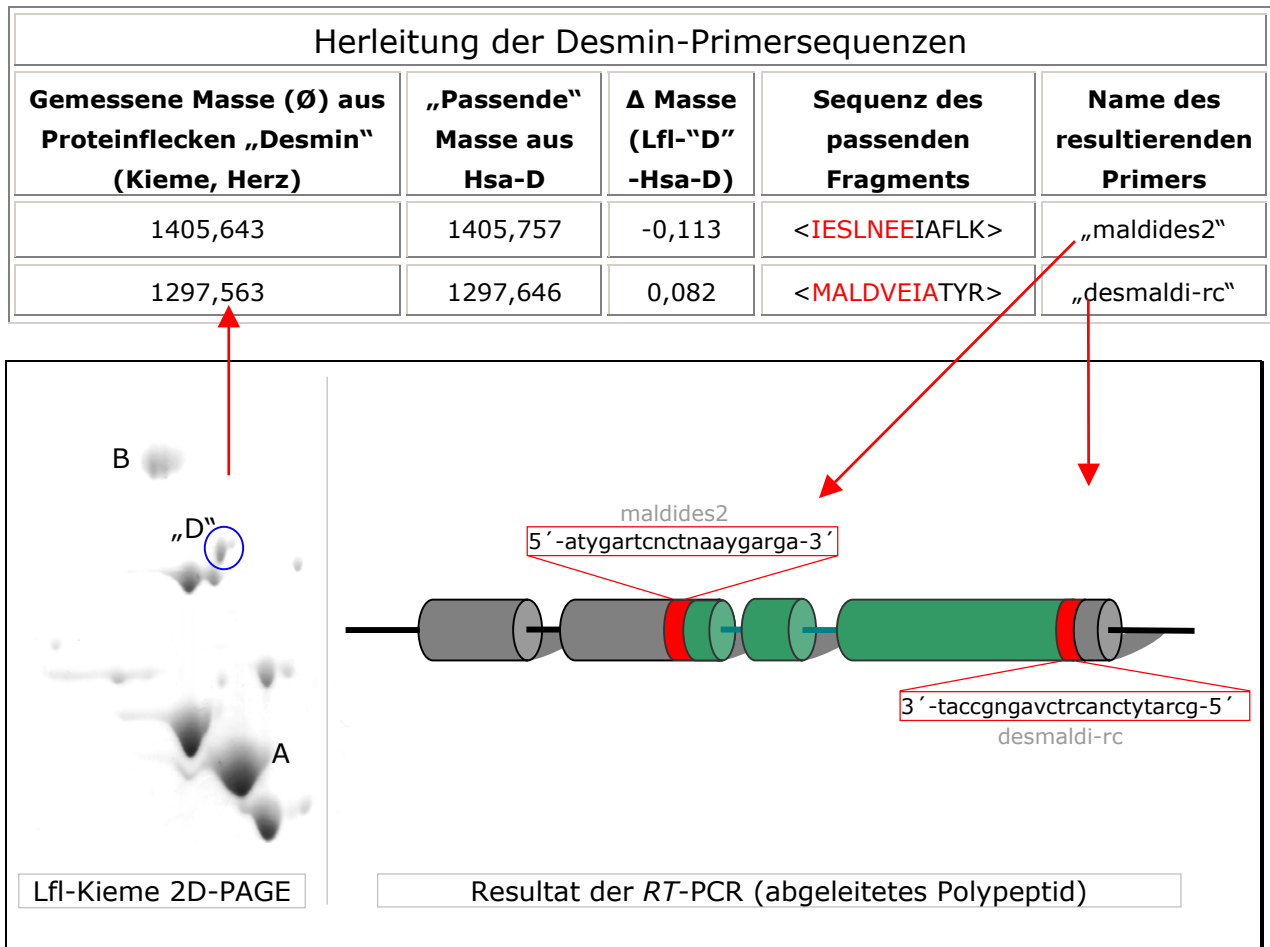


Abb. 18 Herleitung der Primer für die RT-PCR zur Identifikation von Desmin-mRNA des Neunauges. Der Tabellenteil der Abbildung beschreibt den Vergleich zweier Durchschnittswerte von je drei MALDI-MS-Einzelmassenwerten des potentiellen Desminkandidaten vom Neunauge (aus Kiemen- und Herzpräparation, siehe Abb. 23 und F 7.4) mit theoretischen Massen aus der Sequenz des humanen Desmins, Hsa-D (Li et al., 1989). Aus den entsprechenden Oligopeptidsequenzen der übereinstimmenden Fragmentmassen wurden degenerierte Primer synthetisiert (korrespondierende Aminosäuren **rot**). In der Abbildung unten links ist der Proteinfleck der 2D-PAGE (aus Kiemen-Cytoskelettpräparation) **blau** eingekreist, aus dem MALDI-MS-Massewerte ermittelt wurden („D“; Markerproteine: Aktin (A), BSA (B)). Die rechte Seite zeigt die abgeleitete Peptidsequenz des PCR-Fragments *p-lfl-d1* von Lfl-Desmin (**grün**) innerhalb des Proteinmodells mit flankierenden MALDI-MS-Fragmenten und entsprechenden Primersequenzen (**rot** bzw. **rot** umrandet).

Dieser Umweg war notwendig, da die für Desmin codierende Sequenz in einer Vielzahl von Versuchen nicht detektiert werden konnte. Weder für Desmin codierende Sonden aus Katzenhai, Forelle oder Flösselhecht, noch eine Vimentin-spezifische Sonde aus Forelle konnten den cDNA-Klon aus den cDNA-Banken identifizieren. Durch die desminähnliche Sequenz des Neunaugen-Vimentins wurde dieses bei der Suche nach Desmin ständig detektiert. Daneben lokalisierten die Sonden jedoch auch Klone, die codierende cDNA anderer IF-Protein-Klassen beinhalteten (*lfl-k10*, *lfl-k γ 2*, *lfl-k γ 3* sowie *lfl-k1*). Durchgeführte RT-PCR mit desmintypischen Oligonukleotiden amplifizierten neben der Vimentinsequenz auch ein Fragment von *lfl-ka2*. Antikörper, die in Immunblots mit dem potentiellen Desminkandidat reagierten, erkannten in den cDNA-Banken ebenfalls entweder α 2 sowie γ 2

(Antikörper: DE-B-5, sehr schwache Reaktion) oder Vimentin (Antikörper: Anti-Desmin). Einige der Antikörper reagierten im Immunscreening auch komplett negativ (XV2, *Xenopus* anti-Desmin 1-4). Das für Desmin codierende PCR-Fragment als Sonde detektierte in wiederholten cDNA-Screenings keine Phagenklone. Offenbar sind in allen hergestellten cDNA-Banken keine für Lfl-D codierenden cDNA-Klone enthalten.

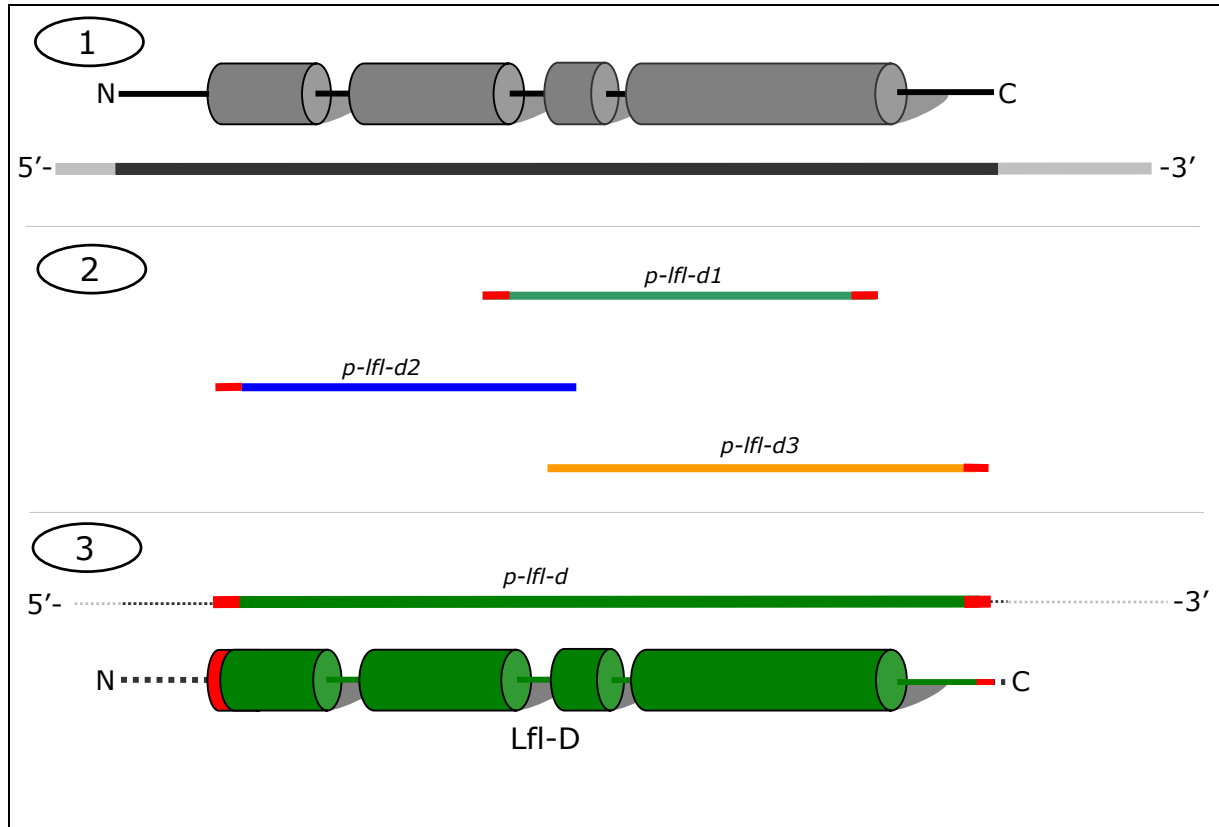


Abb. 19 RT-PCR-Teilkclone, die für Desmin des Neunauges (Lfl-D) codieren. **Rot** sind degenerierte Primer bzw. deren abgeleitete Peptidsequenz abgebildet. **1:** schematische Abbildungen des Proteinmodells mit Domänenstruktur und mRNA-Struktur eines IF-Proteins. **2:** Die drei PCR-Fragmente, die für Lfl-Desmin codieren, an ihrer entsprechenden Position bezüglich der mRNA. **3:** Zusammengesetzte Klone *p-lfl-d* und daraus abgeleitetes Polypeptid Lfl-D mit Domänenstruktur. Grau bzw. schwarz gestrichelt sind die noch unbekannt Bereiche der Sequenz.

Vom nun bekannten Fragment (*lfl-d1*) ausgehend konnte die codierende Sequenz des Desmins nun mit spezifischen und degenerierten Oligonukleotiden durch RT-PCR-Versuche mit RNA aus der Kieme weiter in 5'- (Primer: „lfl-d_d_5b“, PCR-Klon: *p-lfl-d2*) und 3'- Richtung (Primer: „Omydestail“, PCR-Klon: *p-lfl-d3*) entschlüsselt werden. Die abgeleiteten Polypeptidsequenzen dieser Fragmente stellen auf der 5'-Seite den Beginn der helikalen Rod-Domäne dar, auf der 3'-Seite umfasst der PCR-Klon vermutlich die nahezu komplette Tail-Domäne. Die zusammengesetzte cDNA-Sequenz der drei PCR-Klone wird im folgenden mit *p-lfl-d* bezeichnet. In Abb. 19 ist die Position der PCR-Fragmente innerhalb der mRNA bzw. des abgeleiteten Proteins dargestellt. Versuche zur Amplifikation des 5'- bzw. des 3'-Endes der mRNA verliefen nicht erfolgreich. Die abgeleitete Aminosäuresequenzen von Lfl-V und Lfl-D zeigt Abb. 20, die DNA-Sequenzen finden sich im Anhang unter F 8.4.

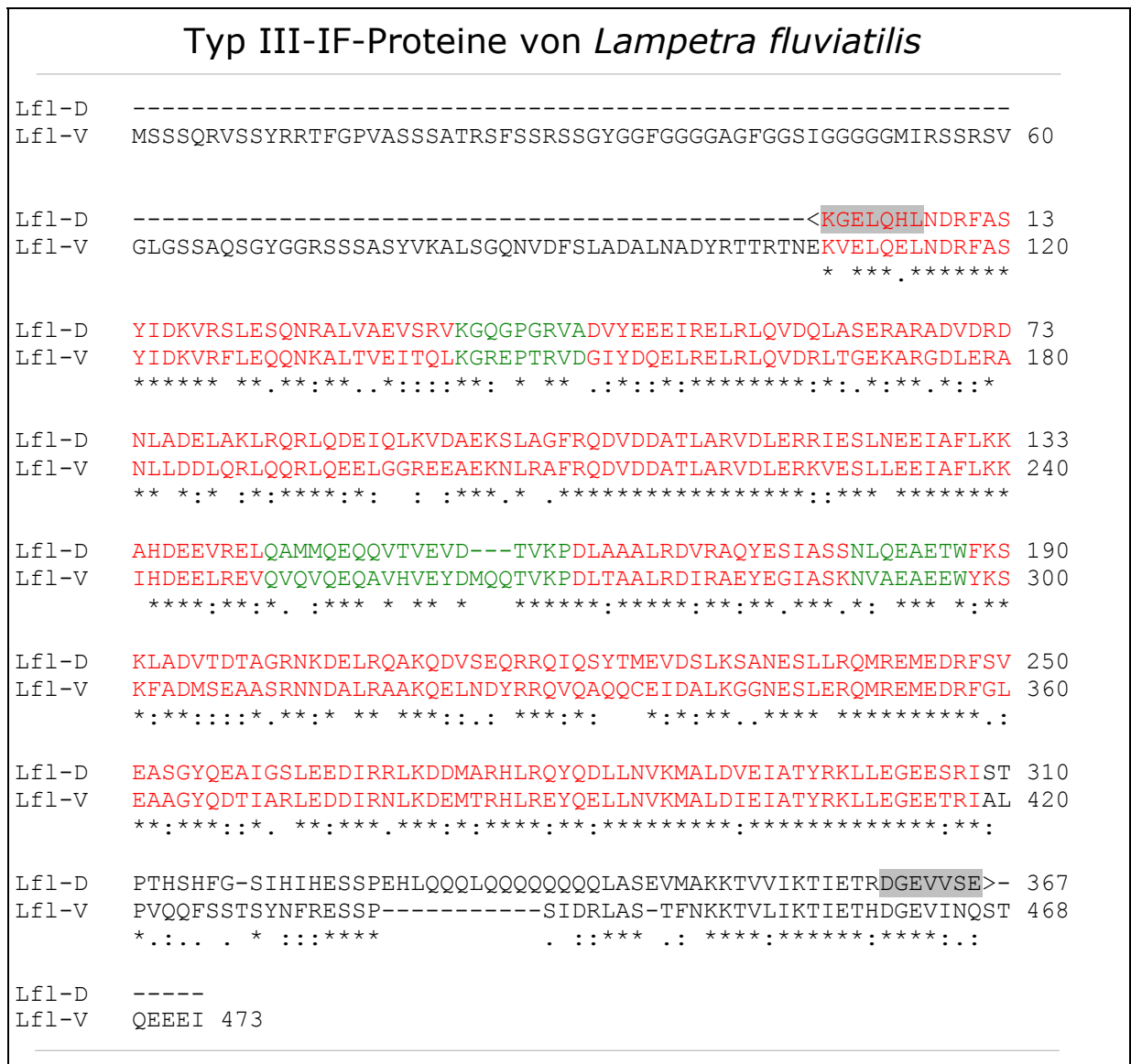


Abb. 20 Abgeleitete Aminosäuresequenz des für das Typ III-IF-Protein Vimentin codierenden cDNA-Klons *lfl-v*, sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz der für Desmin codierenden, zusammengesetzten PCR-Teilklone *p-lfl-d* im Alignment (ClustalX, multiple sequence alignment). In den Aminosäuresequenzen sind - wie in der Einleitung erläutert - die typischen IF-Proteindomänen nach Conway und Parry (1988) farblich unterschiedlich hervorgehoben. Sterne (*), Doppelpunkte (:), und einfache Punkte (.) unter den Sequenzen zeigen verschiedene Konservierungsgrade der Aminosäuren an. Die resultierende Aminosäuresequenz von *p-lfl-d* ist auf der N-terminalen (<), sowie auf der C-terminalen (>) Seite des Proteins unvollständig. Grau unterlegt sind die Aminosäuren dargestellt, die aus den degenerierten Primern resultieren, die in den RT-PCR die für Desmin codierende mRNA amplifizierten.

Die aus degenerierten Oligonukleotiden der PCR-Klone resultierenden Aminosäuren, welche die Sequenz von Lfl-D flankieren, sind in Abb. 20 grau unterlegt. Sie wurden aus jeweils hochkonservierten Bereichen abgeleitet und repräsentieren deswegen mit hoher Wahrscheinlichkeit die korrekte Proteinsequenz von Lfl-D. Für vergleichende Analysen und die Erstellung molekularer Stammbäume (siehe Diskussion, D 2.4) wurden sie jedoch nicht mitberücksichtigt.

Innerhalb der helikalen Rod-Domäne sind teilweise lange identische Abschnitte zu sehen. Lfl-V besitzt im Linker L12 einen drei Aminosäuren großen Einschub mit der Sequenz <MQQ>. Ein elf Aminosäuren großer, ebenfalls Glutamin-reicher Einschub ist in der Tailldomäne von Lfl-D zu sehen. Im direkten Vergleich sind die beiden Sequenzen, bezogen auf den Sequenzbereich von Lfl-D, zu 64% identisch (Modell: p-distance ohne Berücksichtigung von Rückmutationen, Standardabweichung: 2,5%). Der 1821 Basenpaar lange cDNA-Klon *lfl-v* codiert im größten ORF für ein 473 Aminosäuren großes Polypeptid mit einer errechneten Molekülmasse von 53,2 kDa sowie einem isoelektrischen Punkt bei pH 5,08. Das resultierende Desminfragment umfasst inklusive Primersequenzen 367 Aminosäuren.

3.2 Expressionsmuster von Vimentin und Desmin beim Neunauge

Verschiedene Gewebe des Neunauges wurden im Rahmen einer von mir mitbetreuten Staatsexamensarbeit von Frau Inga Scheinert in immunfluoreszenzmikroskopischen Versuchen und in Immunblots mit mehreren Antikörpern auf die Expression von Vimentin und Desmin getestet (Scheinert, 2001).

Drei monoklonale Antikörper, die gegen Vimentin gerichtet sind (Vim13.2, Vim14.13 und H5), erkannten in den Gefrierschnitten der Neunaugengewebe durchweg mesenchymal abgeleitete Zelltypen. Teilweise wurden auch Reaktionen in Gliazellen und epitheloiden Zellen wie Linsenepithel und Blutgefäßendothel beobachtet. Muskelzellen wurden von diesen Antikörpern nicht erkannt, wohl aber das dort vorhandene Bindegewebe. Ebenso reagierten die Sekundärlamellen der Kieme positiv.

Immunblots aus Cytoskelettpräparationen dieser Gewebe zeigten an der vermuteten Vimentinposition eine spezifische Reaktion mit dem Antikörper Vim13.2 und eine etwas weniger spezifische Reaktion mit dem monoklonalen anti-Desmin-Antikörper D33.

Die Reaktionen der Körperwand-Immunblots mit mono- und polyklonalen anti-Desmin-Antikörpern zeigt Abb. 21. Positiv reagierte ein anti-(Huhn)-Desmin-Antiserum („anti-Desmin“) sowohl mit dem Vimentinkandidat, als auch mit dem Desminkandidat (Abb. 21 b). Die anti-(*Xenopus*)-Desmin-Antiseren „*Xenopus* anti-Desmin 1 und 2“ markierten dagegen den Desminkandidaten deutlich stärker als das Vimentin. Diese Antikörper reagierten auch mit einem Protein, welches von seiner relativen Position im Gel das keratinähnliche Protein K α 1 sein könnte (Abb. 21 c, d; vgl. C 2.3 und Abb. 23 a, c). Ausschließlich mit dem Desminkandidaten reagierte – wenn auch schwach - nur der monoklonale anti-Desmin-Antikörper DE-B-5 (Abb. 21 e).

In der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie an Gefrierschnitten der Kieme, der Körperwand und der Skelettmuskulatur konnten mit keinem der anti-Desmin-Antikörper deutliche Reaktionen erzielt werden.

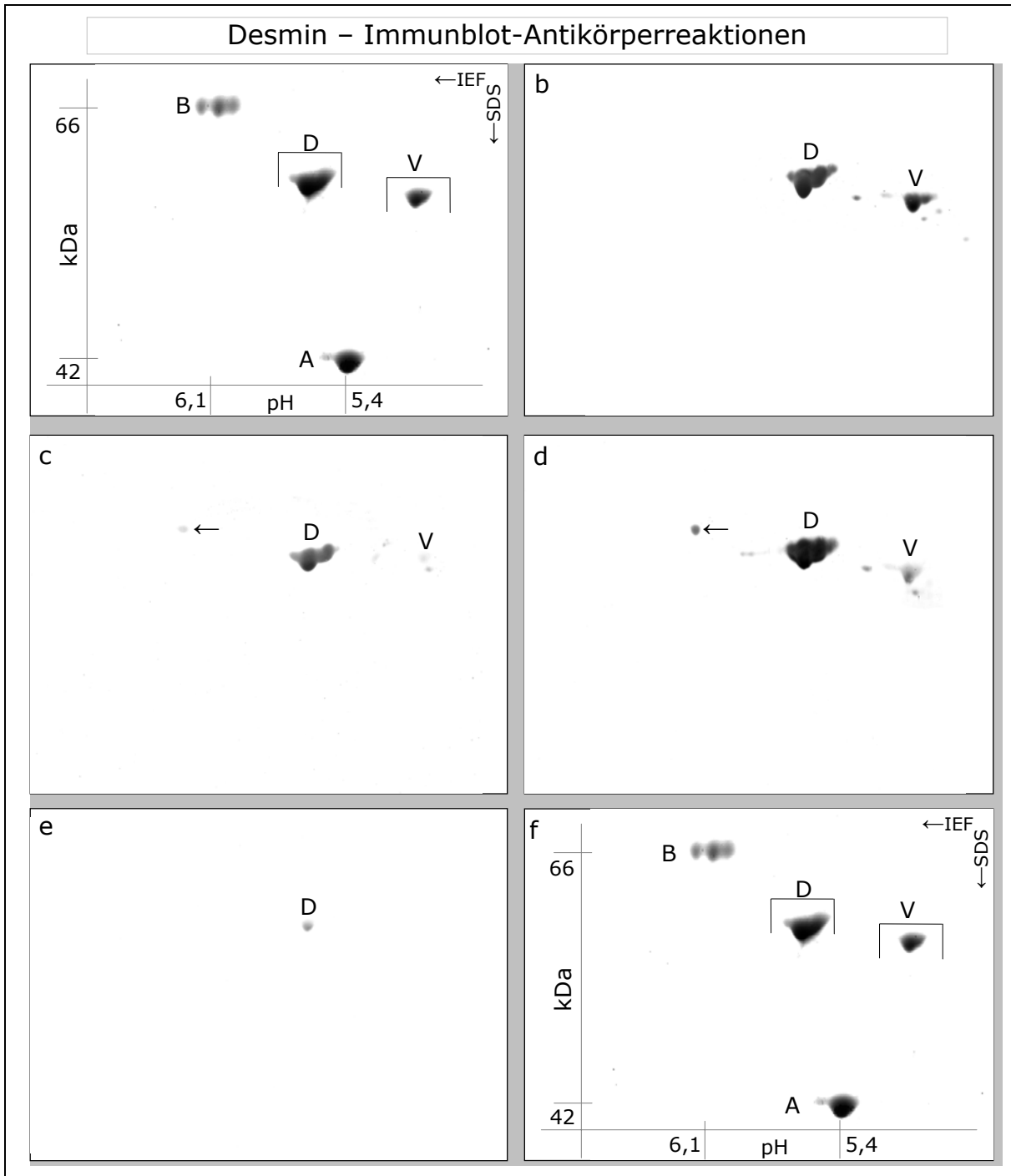


Abb. 21 Reaktionen von Anti-Desmin-Antikörpern in Immunblots von Cytoskelettpräparationen nach 2D-PAGE. **a** und **f**: 2D-PAGE einer Cytoskelettpräparation der Körperwand, gefärbt mit Coomassie Brilliant Blue (1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF), 2. Dimension: SDS-PAGE; Markerproteine BSA (B) und Aktin (A); Desmin (D) und Vimentin (V)). **b**: Anti (Huhn)-Desmin Antiserum „anti-Desmin“; es markierte in gleicher Intensität Vimentin und Desmin. **c** Anti-(*Xenopus*)-Antiserum „anti Desmin 1“ **d**: Anti-(*Xenopus*)-Antiserum „anti Desmin 2“. Die beiden *Xenopus*-anti-Desmin-Antiseren markierten auch ein weiteres Protein (schwarzer Pfeil). **e**: Der Antikörper DE-B-5 war von den untersuchten Antikörpern der einzige, der – wenn auch nur schwach – den Desminkandidaten exklusiv erkannte.

4. cDNA-Klon, der für ein Typ IV-IF-Protein codiert (Lfl-NF_L)

In der von mir mitbetreuten Staatsexamensarbeit von Frau Inga Scheinert, die u.a. cDNA-Banken-Screenings mit einer Sonde aus *lfl-ka2* durchführte, wurde ein unvollständiger Klon (715 bp) eines Typ IV-Neurofilament-Proteins detektiert (Scheinert, 2001). Der für die vollständige Aminosäuresequenz Lfl-NF_L codierende Klon *lfl-nf_1* (1608 Basenpaare) konnte dann von mir - mit dem Teilklon als Sonde - aus der cDNA-Bank Z III isoliert werden Abb. 22. Die Nukleotidsequenz findet sich im Anhang unter F 8.5.

	1	11	21	31	41	51	
1	MYANERRSVS	SLRSQQPSRR	VSPASVRFAA	TPSSYSYPGL	GAVSLSYASA	PHSASSYYQ	60
61	SSGLAFAEAF	DFAQANSLNT	EMLALRSQEH	EDLKGLNDRF	AGFIEKVHSL	EQQNRLETE	120
121	LLALRKFSG	GAGGGQQR	RELYEREIRE	LRAQADEEQA	EKARMEAARD	QLRGVLERTE	180
181	AKLEEEARAR	ERAEERALRA	REDAERAALA	NAELDRRIAS	LLDEIAFLKR	LHDMEISELL	240
241	PQIRSVTAVV	EMAAEASRPD	LSVALHDIRS	QYEKLAAKNM	QVAEDWYRTK	FQVVTESAAR	300
301	STETVRSIRE	ESSEYKRLIQ	SRQSEIEGLK	NINESLLKQI	QDLDEKHGDD	LAKQQERIHE	360
361	LEDHIRDAKK	EMARYLKEYQ	DLLNVKMALD	IEIAAYRKL	EGEEIRYSYS	QTPLFI	416

Lfl-NF_L

Abb. 22 Abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons *lfl-nf_1* Der **1608 bp** große Klon beinhaltet ein offenes Leseraster für ein **416 Aminosäuren** langes Polypeptid mit einer errechneten **Molekülmasse von 47463 Da** (einschließlich des ersten Methionins), sowie einem theoretischen **pI von pH 5,33**. Die Einteilung in die verschiedenen Domänen der IF-Proteinsequenz durch Farbmarkierungen erfolgte, wie in der Einleitung erläutert, nach Conway und Parry (1988).

Auffällig ist vor allem die nur neun Aminosäuren umfassende „Tail-Domäne“, während die Head-Domäne mit 89 Aminosäuren eine „normale“ Länge aufweist. Der „Tail“ ist bei diesem Protein tatsächlich stark verkürzt und nicht etwa der Sequenzierung entgangen, da die Nukleotidsequenz in einen 3'-UTR von 241 bp übergeht. Da insgesamt drei Klone aus zwei verschiedenen cDNA-Banken (Z I, Z III) isoliert und sequenziert wurden, die die Sequenz in diesem Bereich abdecken, ist das ungewöhnliche Ende der abgeleiteten Polypeptidkette nicht auf einen Leserastersprung innerhalb der cDNA zurückzuführen. Die aus den drei Leserastern abgeleiteten Aminosäuresequenzen des 3'-UTR ergeben laut Datenbankanalyse (BlastX, BlastN) keinerlei Homologien zu bekannten IF-Proteinen. Der GC-Gehalt der codierenden Sequenz ist sehr hoch mit 67% (vgl. Tab. 7).

Vergleiche mit Neurofilament-Proteinen anderer Organismen zeigen, dass es sich bei dem entdeckten Klon wahrscheinlich um ein Neurofilament vom L-Subtyp handelt (Light), wobei die genaue Zuordnung zu einem der drei Neurofilament-Subtypen anhand der Aminosäuresequenz durch die fehlende Tail-Domäne erschwert wird.

5. *Massenspektrometrische Identifizierung der sequenzierten IF-Proteine (MALDI-MS)*

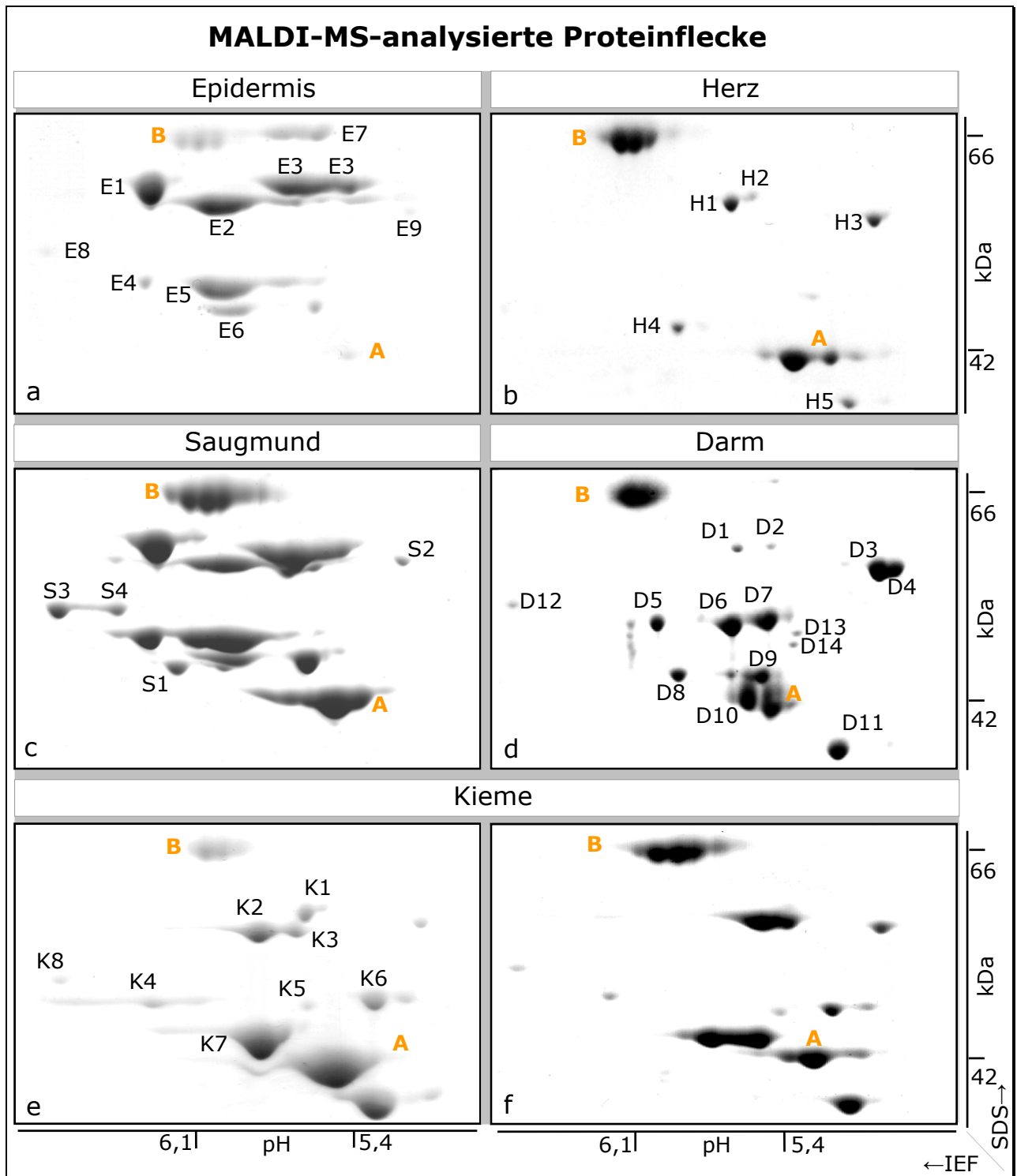


Abb. 23 Für MALDI-MS-Analyse ausgewählte Proteinflecke aus der 2D-PAGE von Cytoskelettpräparationen verschiedener Gewebe. Die Proteine sind nach der Größe (2. Dimension, SDS, von oben nach unten) und nach der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension, IEF, von links nach rechts) aufgetrennt. Die Elektrophorese der Kiemenpräparation (e) erfolgte zwecks besserer Auftrennung unter anderen Bedingungen (vgl. Abb. 18). Markerproteine sind BSA (B) und Aktin (A). Die Hauptproteine aus Epidermis (E), Herz (H), Saugmund (S), Darm (D) und Kieme (K) wurden nummeriert und nach tryptischem Verdau mit MALDI-MS untersucht.

Um die ermittelten Sequenzen von *Lampetra fluviatilis* mit den biochemisch als IF-Proteine identifizierten Flecken der 2D-PAGE in Beziehung zu setzen, wurde „Peptide-Mass-Mapping“ nach einer MALDI-Analyse der betreffenden Proteine durchgeführt. In Abb. 23 sind die hierfür ausgewählten Proteinflecke zu sehen. Verwendet wurden die Hauptproteine der Cytoskelettpräparationen aus Epidermis, Herz, Saugmund, Darm und Kieme. Nur in einer besonders langen Elektrophorese mit besonders engem pH-Bereich konnten K1 von K2 und K3 getrennt werden. Dieses Gel ist deswegen in der Abb. 23 e in einem anderen Seitenverhältnis gezeigt. Die „normale“ Auftrennung der Kiemenpräparation zeigt Abb. 23 f. Die tabellarischen Auswertungen und Interpretationen der Massenspektren finden sich im Anhang unter F7.

Die Auswertung der Massenspektren verlief in zwei Stufen. Vor dem direkten Vergleich der Sequenzen mit den Daten der MALDI-MS-Analyse wurden die Spektren elektrophoretisch und biochemisch vergleichbarer Flecke aus den verschiedenen Geweben miteinander verglichen. Dies sollte klären, ob identische Proteine in mehreren isoelektrischen Varianten bzw. in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Tab. 5 zeigt diejenigen Proteinkandidaten, die aufgrund dieses Vergleichs wahrscheinlich identisch sind.

Tab. 5 Identitäten der Proteinflecke aus der 2D-PAGE aufgrund von MALDI-MS-Spektren, isoelektrischen Punkten, Molekülmassen, CKBB-Tests und Immunblots. Zusätzlich ist die Anzahl der Übereinstimmungen bei mindestens zwei Mitgliedern und Geweben der Gruppe genannt. (*) Die Gruppen 9 u. 10 reagierten negativ im CKBB-Test, jedoch positiv in Immunblots mit anti-Vimentin bzw. anti-Desmin-Antikörpern.

Nr.	Identitäts-Gruppe Proteinflecken aus 2D-PAGE	Anzahl Massen insgesamt	Anzahl Massen-Entsprechungen alle Flecke/ mind. 2 Flecke/ mind. 2 Gewebe	pI (Gele) pH (geschätzt)	Molekül-masse (Gele) (kDa) (geschätzt)	Ergebnis des CKBB-Tests und Immunblots
1	E2; K2, K3; D1, D2	56	6 / 29 / 21	5,3-5,9	56-60	Typ I
2	E6, K5	35	16	5,4-5,6	47	Typ I
3	D11, H5	35	7	5,1-5,2	40	Typ I
4	D12; K8; S4, S5; E8	78	3 / 30 / 23	6,5-6,8	51	Typ II
5	E4, E5; K4	29	8 / 17 / 17	5,7-6,2	50	Typ II
6	D13, D14; K6	40	4 / 12 / 7	5,2	47-49	Typ II
7	H4; D8, D9; K7	43	11 / 18 / 10	5,5-5,7	45	Typ II
8	D5, D6, D7	23	11 / 17 / -	5,5-5,9	50	Negativ
9	H3; D3, D4; S2, E9	72	11 / 27 / 22	5,0	53	Typ III*
10	H1, H2, K1	52	7 / 17 / 14	5,5-5,6	60	Typ III*

Neun der zehn Identitätsgruppen enthalten demnach übereinstimmende Proteine aus verschiedenen Geweben und reagieren im CKBB-Test bzw. Immunblot positiv. Die Identitätsgruppen 1 bis 3 haben jeweils bis zu zwölf Übereinstimmungen zueinander, liegen jedoch in den Gelen weit auseinander. Die Identitätsgruppe Nr. 8 mit den Proteinflecken D5, D6 und D7 trat nur im Darmgewebe auf und reagierte im CKBB-Test und in Immunblots negativ. Die Proteinflecke E1, E3, E7, D10 und S1 konnten keiner Gruppe zugeordnet werden.

In der zweiten Stufe der biochemischen Identifizierung der IF-Proteine wurden die gemessenen Spektren mit den theoretischen aus den Sequenzdaten abgeleiteten verglichen (ExPasy, Internet, siehe Anhang unter F9). Bei Peptidfragmenten, die Methionine enthalten wurde fakultativ auch die Masse des oxidierten Schwefels berücksichtigt (Fragmentmasse + ~16).

Die meisten Entsprechungen treten bei den Massen komplett gespaltener Trypsinfragmente auf (Anzahl der nicht verwendeten tryptischen Spaltstellen = 0). Daneben gibt es jedoch auch Übereinstimmungen von Massen bei Fragmenten, die nicht komplett gespalten wurden, sondern bei denen eine - in seltenen Fällen auch zwei - mögliche Spaltstellen für Trypsin übersprungen wurden. Um als identisch zu gelten, durfte die Differenz zwischen den Vergleichswerten den Wert 0,2 nicht überschreiten (Wilkins et al., 1997). Die maximal mögliche prozentuale Abweichung für ein kleines Oligopeptid mit einer Masse von 650 Da liegt dann bei 0,03%. Tatsächlich wurde aber bei fast allen passenden Fragmentmassen, die im Bereich zwischen 650 Da und 3600 Da lagen, eine Differenz von 0,1 und weniger beobachtet. Tab. 6 zeigt die Ergebnisse der biochemischen Identifizierung der abgeleiteten Proteinsequenzen der für IF-Proteine codierenden cDNA-Klone des Neunauges.

Tab. 6 Massenspektrometrische Identifizierung der abgeleiteten Proteinsequenzen von Keratinen, Vimentin und Desmin des Neunauges. (*) Der Proteinfleck E3 stellt vermutlich ein Gemisch aus Lfl-K γ 1 und Lfl-K γ 2 dar. (**) Den Polypeptidsequenzen Lfl-K2 und Lfl-D fehlt aufgrund unvollständiger cDNA-Klone ein Teil der Head-Domäne.

(Identitätsgruppe) Proteinfleck(e)	Gemessene Massewerte insgesamt	Abgeleitete Proteine aus den cDNA-Sequenzen	Anzahl „passender“ Massen
(1) E2; K2, K3; D1, D2	56	Lfl-K10	30
(2) E6, K5	35	Lfl-K11	28
(3) D11, H5	35	Lfl-K18	18
(4) D12; K8; S4, S5; E8	78	Lfl-K2**	30
(5) E4, E5; K4	29	Lfl-K1	17
(6) D13, D14; K6	40	Lfl-K8	21
(7) H4; D8, D9; K7	43	Lfl-K3	27
E1	50	Lfl-K α 1	22
E3*	34	Lfl-K γ 1 / Lfl-K γ 2	15 / 14
(9) H3; D3, D4; S2, E9	72	Lfl-V	38
(10) H1, H2, K1	52	Lfl-D**	16

Bei der Identifizierung der Typ I-Keratine war es aufgrund der hohen Identitäten der Sequenzen in der Rod-Domäne nötig, auch jeweils Fragmente aus den variableren Head- oder Tail-Domänen in den Spektren zu detektieren. Dies war in allen drei Fällen möglich (siehe F 7.1) und korreliert auch mit den theoretischen Daten bezüglich pI und - mit Ausnahme von Lfl-K18 - der Größe des Proteins. Lfl-K18 hat eine theoretische Molekülmasse von 42 kDa, das identifizierte Protein wanderte jedoch in der zweiten Dimension der 2D-PAGE schneller als der Marker Aktin (ebenfalls 42 kDa). Es wurde jedoch vermutlich nicht proteolytisch gespalten, da Fragmente aus der Head-Domäne und vom C-terminalen Ende des Proteins den Spektren eindeutig zugeordnet werden konnten (vgl. Anhang unter F 7.1).

Der nur im Saugmund-Cytoskelett auftretende und durch den CKBB-Test als Typ I-Keratin identifizierte Fleck S1 hat in seinem Spektrum (32 Massewerte) mit Lfl-K18 zwei, mit Lfl-K10 drei und mit Lfl-K11 sieben Übereinstimmungen. Auch dies charakterisiert S1 als Typ I-Keratin (vgl. C 2.4), wobei die Sequenzidentitäten zu den drei anderen Typ I-Keratinen möglicherweise geringer sind als deren Ähnlichkeit untereinander.

Die keratinartigen Proteine Lfl-K γ 1 und Lfl-K γ 2, die nach theoretischen Berechnungen die gleiche Masse sowie denselben Wert für den isoelektrischen Punkt haben (vgl. C 2.1), lassen sich beide eindeutig E3 zuordnen. Aus der lanzogenen Proteinbande im Gel (Abb. 23 a) wurden zwei MALDI-MS-Analysen von verschiedenen Stellen durchgeführt; sie lieferten identische Massewerte. Mit Ausnahme von drei kleineren Werten sind es stets unterschiedliche Massen, die zu jeweils einer der beiden Proteinsequenzen passen. Offensichtlich liegen in E3 zwei unterschiedliche IF-Proteine vor, die sich durch 2D-PAGE nicht auftrennen ließen.

Die keratinartigen Proteine Lfl-K α 2 und Lfl-K γ 3 ließen sich anhand der Spektren nicht identifizieren. Es kommen auch aus in der 2D-PAGE anhand der theoretischen Größe und Ladung dieser Proteine keine möglichen Kandidaten dafür in Betracht (Lfl-K α 2: 67 kDa, pI: 8,80, Lfl-K γ 3: 54,2 kDa, pI: 4,97), obwohl im Falle von Lfl-K α 2 NEPHGE-Experimente zur Abdeckung eines breiteren pH-Spektrums aus Epidermis und Kieme vorlagen (Brauer, 1993).

Das Spektrum des Desmins aus der 2D-PAGE von Herz-Cytoskelett zeigte trotz eindeutig positiver Reaktion im CKBB-Test an dieser Position (vgl. C 2.4) nur eine einzige mit der Keratingruppe (Identitätsgruppe 1, Lfl-K10) übereinstimmende Masse, so dass von einer im Verhältnis zum Desmin schwachen Expression des Typ I-Keratins ausgegangen werden kann (vgl. Abb.17 e und e').

Den ausschließlich im Darm auftretenden Proteinen D5, D6, D7 (Identitätsgruppe 8) sowie D10 (32 Messwerte) ließen sich keine Sequenzdaten zuweisen. Eine mit dem Internetprogramm „PeptIdent“ durchgeführte Datenbanksuche nach IF-Proteinen mit ähnlichen Massen, Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten (Wilkins und Williams, 1997) führte zu keinem Ergebnis. Da diese Flecke auch im CKBB-Test und in Immunblots negativ reagierten und in anderen Geweben gar nicht auftraten handelt es sich bei D5, D6, D7 und D10 wahrscheinlich nicht um IF-Proteine.

Der Proteinfleck E7 (insgesamt 35 Messwerte), der in früheren Präparationen nicht auftrat (Brauer, 1993) stimmt in zehn Werten mit Lfl-K10 (E2) überein und in fünf anderen Werten mit Lfl-K γ 1/2 (E3); eine Masse passt zu Lfl-K α 1 (E1). Vermutlich handelt es sich bei E7 um ein Aggregat aus mehreren epidermalen IF-Proteinen, das durch die Präparation nicht vollständig dissoziiert wurde.

6. Katalog der sequenzierten IF-Proteine von *Lampetra fluviatilis*

Die 2D-PAGE der Cytoskelettpräparationen von Kieme und Saugmund, ausgeführt als Koelektrophorese, zeigt alle sequenzierten Keratine und Typ III-Proteine von *Lampetra fluviatilis*, deren biochemische Identität durch die vorliegenden Analysen aufgeklärt ist (Abb. 24). Von einem Typ I-Keratin aus dem Saugmund (ca. 47 kDa, pI: ca. 6,4) liegt keine entsprechende cDNA-Sequenz vor. Desmin und das Typ I-Keratin K10 wandern an fast gleicher Position in der PAGE. Des Weiteren komigrieren K γ 1 und K γ 2 aufgrund ihrer identischen Massen und isoelektrischen Punkte. In Tab. 7 sind alle für IF-Proteine codierenden cDNA-Klone von *Lampetra fluviatilis* zusammengestellt.

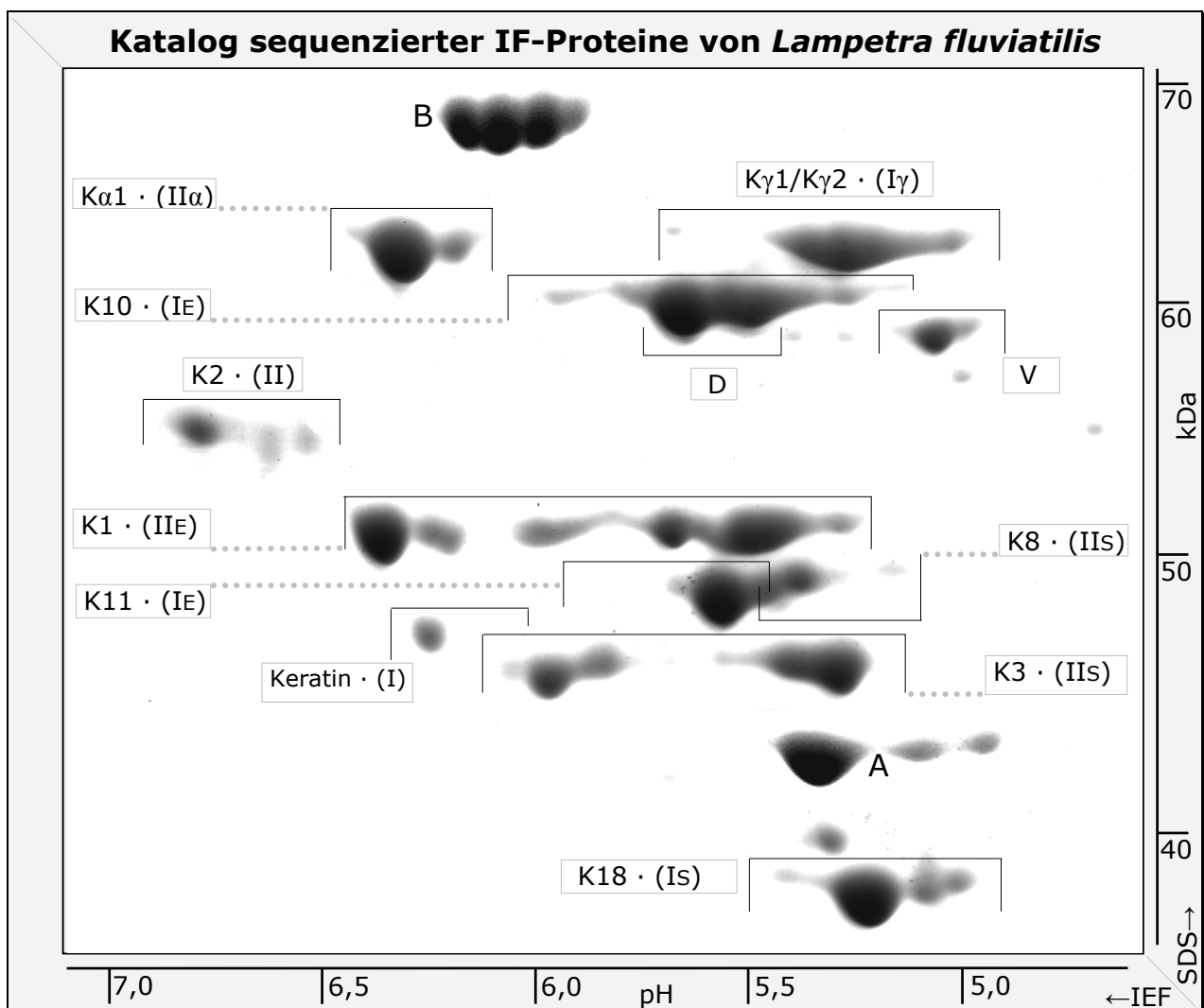


Abb. 24 2D-PAGE (Koelektrophorese) Kieme und Saugmund (1. Dimension: isoelektrische Fokussierung, (IEF); 2. Dimension: SDS-PAGE). Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. Markerproteine Aktin (A) und BSA (B). Die IF-Proteine sind mit **K**(eratin), **D**(esmin) und **V**(imentin) bezeichnet. Der jeweilige Keratintyp (**IS**, **IIS**, **IE**, **IIE**, **II α** , **I γ**) ist – soweit ermittelt - in Klammern angegeben. Desmin komigriert mit K10, ebenso komigrieren K γ 1 und K γ 2.

Tab. 7 Zusammenstellung aller isolierten Klone von *Lampetra fluviatilis*, die für IF-Proteine codieren. Die Anzahl der Nukleotide des 3'-UTR ist ohne die des Poly-A-Schwanzes angegeben. Die Klone *lfl-k2*, *g-lfl-ka3* sowie die zusammengesetzte Sequenz aus *p-lfl-d* enthalten nicht die für das vollständige IF-Protein codierende DNA-Sequenz. Werte, die diese Klone betreffen und vom theoretisch vollständigen Klon bzw. Protein abweichen sind *kursiv* angegeben.

Klon EMBL Accession- Nummer	Quelle (cDNA- Bank)	Länge (bp)	Länge 5'-UTR ORF 3'-UTR (bp)	G/C-Gehalt Codierend/ Gesamte Sequenz (%)	Abgeleitetes Polypeptid Anzahl der Aminosäuren	Masse (Da) pI	Typ	Besonderheiten
<i>lfl-k10</i> AJ308116	Z I, Z II, S I	2922	102 1593 1203	60 / 55	Lfl-K10 531	56272 5,48	Keratin IE (+IS)	cDNA: doppeltes Poly-A-Signal; Repeats im 3'-UTR
<i>lfl-k11</i> AJ308117	Z II	2398	328 1449 600	64 / 63	Lfl-K11 482	50955 5,43	Keratin IE	cDNA: Repeats im 3-UTR
<i>lfl-k18</i> AJ308118	Z II	2509	202 1161 1098	62 / 56	Lfl-K18 387	42613 5,16	Keratin IS	Protein: Tail-Domäne sehr kurz
<i>lfl-k1</i> AJ401159	Z I, Z II	1903	76 1434 373	62 / 59	Lfl-K1 478	51130 5,91	Keratin IIE	
<i>lfl-k2</i> AJ308115	Z I, Z II	1857	? 1315 523	65 / 59	Lfl-K2 438	48226 5,46	Keratin IIS (+IIE)	cDNA 5' Ende unvollständig; kein echtes Poly-A-Signal
<i>lfl-k3</i> AJ308113	Z II	3001	194 1290 1496	63 / 59	Lfl-K3 430	47402 5,43	Keratin IIS	cDNA: langer 3'-UTR
<i>lfl-k8</i> AJ308114	Z II	2696	206 1290 1182	61 / 57	Lfl-K8 430	49234 5,16	Keratin IIS	cDNA: langer 3'-UTR
<i>lfl-ka1</i> AJ289859	Z II	2843	181 1887 750	64 / 61	Lfl-Ka1 629	63326 5,77	Keratin- artig (II)α	entspricht Est-Ka; genomischer Teilkлон vorhanden
<i>lfl-ka2</i> AJ308120	Z II	2779	132 2025 604	66 / 63	Lfl-Ka2 675	67458 8,80	Keratin- artig (II)α	entspricht Est-Ka; genomischer Teilkлон vorhanden
<i>g-lfl-ka3</i>	Z I	ca. 3000	657	66 / --	<i>Hypothetisch: „Lfl-Ka3“ 219</i>	--	Keratin- artig (II)α	Genfragment, 2 vollst. Exons: Coil 2B und Tail-Domäne
<i>lfl-ky1</i> AJ289860	Z I, Z II	2012	81 1677 234	63 / 60	Lfl-Ky1 559	58996 5,20	Keratin- artig (I)γ	entspricht Est-Ky
<i>lfl-ky2</i> AJ308111	Z II	2068	77 1710 262	63 / 59	Lfl-Ky2 570	58991 5,20	Keratin- artig (I)γ	entspricht Est-Ky
<i>lfl-ky3</i> AJ308112	Z II	2365	97 1572 677	63 / 60	Lfl-Ky3 524	54253 4,97	Keratin- artig (I)γ	entspricht Est-Ky
<i>lfl-v</i> AJ278487	Z I, ZII	1821	69 1419 303	63 / 60	Lfl-V 473	53252 5,08	Vimentin III	Proteinsequenz Desmin-ähnlich
<i>p-lfl-d</i> AJ308121	Muskel- und Kiemen- RNA	1103	? 1103 ?	62 / ?	Lfl-D 367	42183 5,00	Desmin III	5'- und 3'- unvollständiges Fragment. „lfl-d“-Klon nicht in cDNA-Banken.
<i>lfl-nf_I</i> AJ308119	Z I, ZIII	1608	99 1248 241	67 / 65	Lfl-NF_L 416	47463 5,33	L-Neuro- filament IV	Protein: Tail-Domäne sehr kurz

D Diskussion

1. *Expression der IF-Proteine von Lampetra fluviatilis*

In dieser Arbeit wurden erstmalig die IF-Proteine des Flussneunauges *Lampetra fluviatilis* in ihrer Aminosäuresequenz beschrieben: zehn der fünfzehn ermittelten Proteinsequenzen konnten allein durch Datenbankvergleiche den IF-Typen I-IV eindeutig zugeordnet werden. Sequenzen von cytoplasmatischen Keratinen, Vimentin und Desmin waren von kieferlosen Wirbeltieren (Agnathen) bis jetzt noch nicht bekannt. Danach besitzt das Neunauge mindestens acht verschiedene Keratine, jeweils vier Typ I- und Typ II-Keratine. Von diesen wurden drei Typ I-Keratine und alle vier Typ II-Keratine über cDNA-Klone sequenziert und ihre gewebespezifische Expression analysiert. Ein weiteres, nur im Saugmund auftretendes Keratin konnte biochemisch und durch MALDI-MS-Analyse als viertes Typ I-Keratin charakterisiert werden.

Laut gewebespezifischer Immunfluoreszenzmikroskopie treten die Keratine des Flussneunauges bis auf wenige Ausnahmen (Endomysium, Blutgefäßendothel und Astrocyten) nur in Epithelien auf (Brauer, 1993). Dies gilt auch für die meisten anderen Vertebraten. Lediglich bei den Teleostern (moderne Knochenfische) existiert eine starke Erweiterung der Keratin-Expression auch auf mesenchymale Zelltypen. Diese Abweichung in den Expressionsmustern wurde bei der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* entdeckt (Markl und Franke, 1988) und durch Untersuchungen am Karpfen *Cyprinus carpio* (Bauer, 1996; Groff et al., 1997) und einem zweiten Cypriniden, dem Zebra-*Danio rerio* bestätigt (Conrad et al., 1998). Nach den vorliegenden biochemischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Versuchen übernimmt bei *Lampetra fluviatilis* das Vimentin (Lfl-V) die Aufgabe, das IF-Netzwerk in den mesenchymal abgeleiteten Geweben zu bilden (Scheinert, 2001). Dies entspricht den Ergebnissen der Untersuchungen an Tetrapoden und Knorpelfischen (Franke et al., 1978; Moll und Franke, 1982; Herrmann et al., 1989a; Schaffeld et al., 2001b). Die breitgefächerte mesenchymale Expression der Keratine innerhalb der modernen Knochenfische ist demnach vermutlich ein autapomorphes Merkmal innerhalb der Evolutionslinie der Strahlenflosser (Schaffeld et al., 2001a).

Die biochemische Identifizierung der sequenzierten cytoplasmatischen Keratine in den Geweben ermöglicht auch deren Unterteilung in „E“- (Keratine der mehrschichtigen Epidermis) und „S“-Keratine (Keratine der einschichtigen Epithelien). Die Bezeichnungen „E“ und „S“ wurden bei den Teleostern eingeführt (Markl et al., 1989; Conrad et al., 1998) und zwar in Anlehnung an die Keratin-Kategorien der Säuger (Moll und Franke, 1982). Die Trennung der Expressionsorte ist beim Neunauge weitgehend deutlich und damit den höheren Wirbeltieren und Knorpelfischen ähnlich (Schaffeld et al., 1998). Die meisten Neunaugen-Keratine können demnach zweifelsfrei anhand ihrer exklusiven Expression in einem bestimmten Epitheltyp den beiden Subtypen zugeordnet werden. So gibt es je ein Typ IE-Keratin (K11), ein Typ IIE-Keratin (K1), ein Typ IS-Keratin (K18) und zwei Typ IIS-Keratine (K3 und K8). Das Typ I-Keratin K10 wird in allen untersuchten Epithelgeweben

exprimiert. In der Epidermis, im Saugmund und in der Kieme tritt es aber wesentlich konzentrierter auf als in Darm oder Herz, weshalb es - mit Einschränkung - als „E“-Keratin bezeichnet werden kann. Das ausschließlich im Saugmund exprimierte vierte Typ I-Keratin sowie das Typ II-Keratin K2 lassen sich nicht eindeutig in die Kategorien „E“ und „S“ einteilen. K2 wird in Darm, Kieme und vor allem im Saugmund exprimiert, jedoch kaum in der Epidermis und nicht im Herz. Im Herz wurden neben Vimentin und Desmin kleinere Mengen der „S“-Keratine K3 und K18 sowie das IE-Keratin K10 detektiert, die vermutlich aus dem umgebenden Coelomesothel oder dem Blutgefäßendothel stammen. Die Besonderheit des Saugmundepithels hinsichtlich der Keratin-Expression deckt sich gut mit den Immunfluoreszenzen, die im Vergleich mit der Körper-Epidermis andersartige Antikörperreaktionen zeigten (Brauer, 1993).

Die vorliegenden Untersuchungen verdeutlichen, dass die aus der 2D-PAGE abgeleiteten Eigenschaften „basisch“ und „größer“ für Typ II-Keratine (pI 5,5-7,5; 55 kDa-67 kDa) bzw. „sauer“ und „kleiner“ für Typ I-Keratine (pI 4,5-5,5; 40 kDa-54 kDa) nur für höhere Vertebraten kennzeichnend sind. Ebenso wie bei Forelle und Zebrafisch (Teleosteer; Markl et al., 1989; Conrad et al., 1998) sowie beim Katzenhai (Knorpelfische; Schaffeld et al., 1998) sind bei den Keratinen der Agnathen diese synonymen Bezeichnungen nicht sinnvoll: die Werte der isoelektrischen Punkte und die Massen der Typ I- und Typ II-Keratine überlappen beim Neunauge. So ist bspw. das größte Keratin ein Typ I-Keratin (Lfl-K10), das Typ II-Keratin K8 liegt mit seinem pI weiter im sauren Bereich als drei der vier Typ I-Keratine (siehe Ergebnisse, Abb. 24). Insgesamt liegen die isoelektrischen Punkte der Flussneunaugen-Keratine in einem pH-Bereich zwischen 5 und 6,8. Damit entspricht die Verteilung eher der Situation der modernen Knochenfische. Bei höheren Wirbeltieren und beim Katzenhai wurden dagegen auch basische Keratine identifiziert (Moll et al., 1982; Hoffmann et al., 1985; Fouquet, 1991; Schaffeld et al., 1998).

Sowohl Desmin als auch Vimentin konnten beim Neunauge identifiziert und sequenziert werden. Die Aminosäuresequenz von Vimentin weist große Gemeinsamkeiten mit den sequenzierten Desminen der Gnathostomier auf. Neunaugen-Desmin wird wie bei allen untersuchten Wirbeltieren in den Muskelgeweben (Kieme, Körperwand und Herz) exprimiert (Lazarides et al., 1982; Herrmann et al., 1989b; Loh et al., 2000; Schaffeld et al., 2001b). Daneben tritt Vimentin in diesen Geweben in den gleichen Mengen auf. Unklar ist, ob Vimentin dabei in denselben Zelltypen vorkommt oder es sogar zu einer heterodimeren Filamentbildung der beiden Proteine kommen kann. Die den Desminen nahe stehende Primärstruktur des Vimentins läßt allerdings vermuten, dass es zur Bildung desminartiger Filamente befähigt ist (vgl. Diskussion D 2.4). Ungewöhnlich sind auch die großen Mengen von Vimentin im Darmgewebe des Neunauges, während Desmin dort nicht nachgewiesen werden konnte. Ein wesentlicher Unterschied zu den bekannten epidermalen Keratin-Expressionsmustern der Gnathostomier ist die zusätzliche Expression zweier hochspezialisierter IF-Proteine. Fünf der sequenzierten IF-Proteine des Flussneunauges entsprechen den keratinartigen Proteinen $K\alpha$ und $K\gamma$ des Schleimaals *Eptatretus stouti*, ein weiterer Vertreter der Cyclostomata (Koch et al., 1994; 1995). Die unterschiedlichen Antikörperreaktionen von Kolben- und Körnerzellen sowie schleimbildenden

Zellen bestätigen die Komplexität der epidermalen IF-Strukturen von Neunaugen (Brauer, 1993; Alarcon und Filosa, 1994). Ungeklärt ist noch, ob diese Proteine wie bei *Eptatretus stouti* als Komponenten des extracorporalen Schleims in die Umwelt abgegeben werden (Koch et al., 1991a). Im Elektronenmikroskop sichtbare, sehr ausgeprägte Filament-Strukturen in den Kolben- und Körnerzellen der Epidermis des Neunauges *Ichthyomyzon unicuspis* („silver lamprey“) wurden bereits von Downing und Novales (1971) beschrieben.

Der Katalog der sequenzierten IF-Proteine von *Lampetra fluviatilis* (siehe Ergebnisse, Abb. 24) bestätigt den aus biochemischen Daten gewonnenen Keratin-Expressionskatalog (Brauer, 1993; Markl und Schechter, 1998): dort wurden sechs Typ I-Keratine und fünf Typ II-Keratine anhand von CKBB-Tests bzw. Immunblots identifiziert. Biochemisch konnte nicht bestimmt werden, ob das Typ I-Keratin K10 in allen epithelialen Geweben exprimiert wird oder ob es sich um verschiedene Keratine mit ähnlicher Masse und Eigenschaften handelt. Die Expression von K10 in allen untersuchten Geweben konnte dann aber durch MALDI-MS-Analyse nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde der Katalog der IF-Proteine von *Lampetra fluviatilis* um die Typ III-IF-Proteine Vimentin und Desmin sowie um die keratinartigen α - und γ -IF-Proteine erweitert. Da letztere, wie die negativen Reaktionen im CKBB-Test zeigen, nicht mit „echten“ Keratinen kopolymerisieren, bleibt offen, ob man hier tatsächlich von Keratinen sprechen kann (siehe Diskussion D3).

Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, dass die Zusammenführung der Daten aus Immunfluoreszenzmikroskopie, Immunblots und CKBB-Tests einerseits, sowie cDNA-Sequenzierung und Zuordnung der Sequenzen durch 2D-PAGE mittels MALDI-MS andererseits, eine überzeugende Analyse der IF-Proteine im untersuchten Organismus ermöglicht.

2. Molekulare Evolution der IF-Proteine

Ein phylogenetischer Gesamtbaum, der alle bekannten IF-Proteinsequenzen der Eumetazoen berücksichtigt, gibt Aufschluss über mögliche Verwandtschaftsverhältnisse der IF-Typen untereinander sowie über die relative Position der IF-Proteine des Flussneunauges innerhalb der Chordaten (Abb. 25). Von den 351 bekannten IF-Proteinsequenzen aller bisher untersuchten Tierstämme (Internet-Datenbanken, Daten der Arbeitsgruppe und eigene Ergebnisse) waren bei 325 mehr als 90% der helikalen Rod-Domänen-Sequenz bekannt (317 Sequenzen davon waren im untersuchten Bereich vollständig). Diese wurden für die Erstellung des phylogenetischen Baums verwendet. Dazu wurden diese Proteine jeweils paarweise miteinander verglichen („aligniert“). Nach dem ersten Alignment wurden die Sequenzen der Head- und Tail-Domänen deletiert, und mit den verbliebenen Rod-Domänen wurde das Alignment wiederholt. Aus diesem wurde der Gesamtbaum nach der Neighbor-Joining Methode auf Basis des Distanz-Evolutionsmodells JTT errechnet (Jones-Taylor-Thornton, vgl. Material und Methoden, B14).

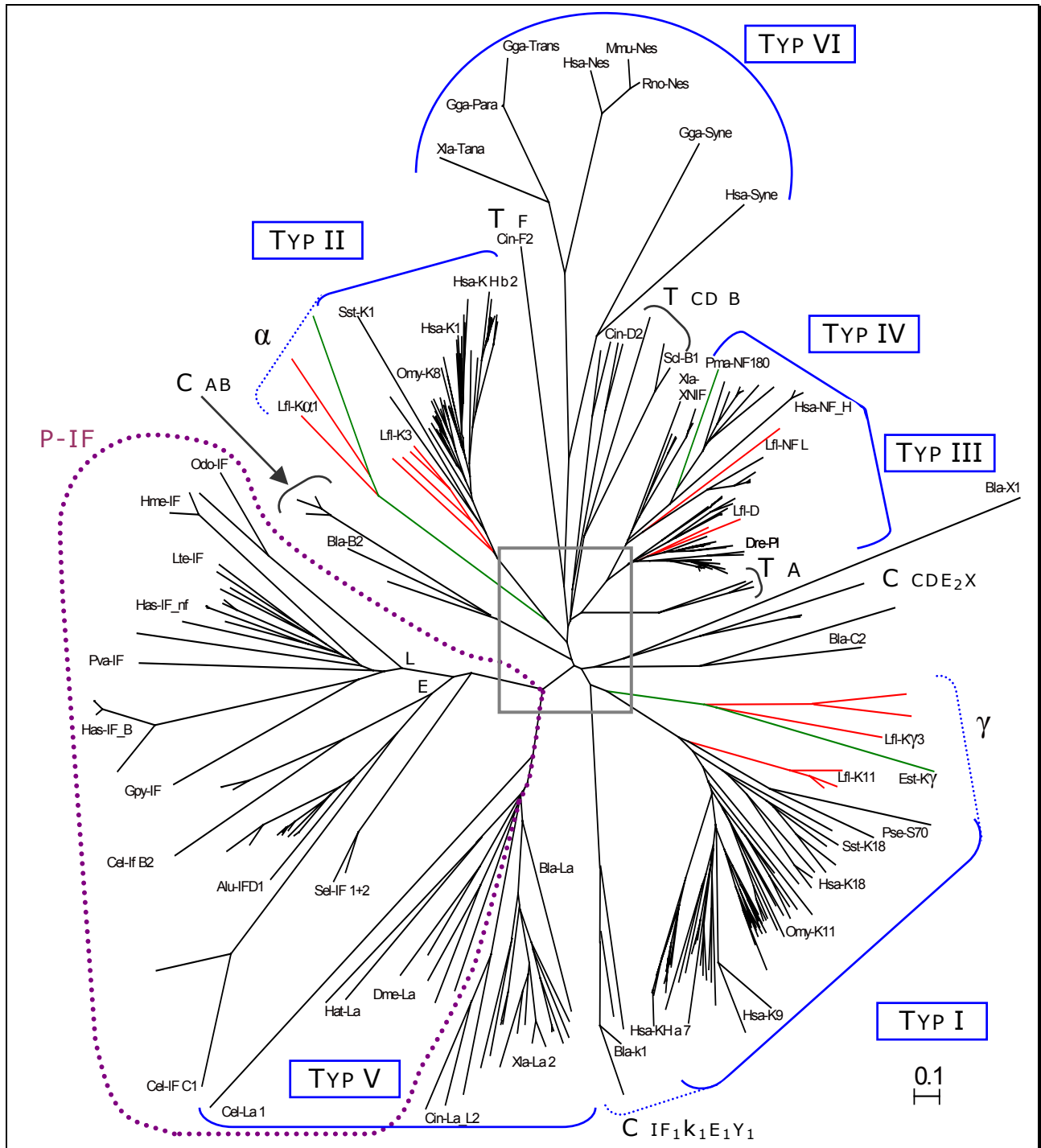


Abb. 25 Phylogenetischer Radial-Baum von 325 IF-Proteinsequenzen aller bisher untersuchten Tierstämme nach einem multiplen Sequenz-Alignment der helikalen Rod-Domänen. Die Distanzmarkierung unten rechts beschreibt 0,1 Aminosäuresubstitutionen pro Position (korrigiert nach JTT). Die Äste der IF-Protein-Typen sind durch **blaue** Markierungen näherungsweise gekennzeichnet. Die IF-Proteine der Protostomier (P-IF) sind durch eine gepunktete **violette** Umrandung gekennzeichnet (L: Lophotrochozoa, E: Ecdysozoa). In dieser Arbeit beschriebene Sequenzen des Flusseunauges sind in **rot**, die drei anderen bekannten IF-Proteine der Agnathen von Schleimaal (Est-K α und Est-K γ) und Meeresneunauge (Pma-NF) in **grünen** Ästen dargestellt. Die IF-Proteine der Cephalochordaten (C) verteilen sich auf drei Äste (IF-Proteingruppen AB (Bfl-A1, -A2, -A3, Bla-B1 -B2), CDE₂X (Bfl-D1, Bla-C1, -C2, -D1, -E2, -X1) und IF₁k₁E₁Y₁ (Bfl-IF1, -k1, Bla-k1, -E1 -Y1)), die der Tunicaten (T) auf die Äste A (Cin-A2, Scl-A1, Spl-A1), CDB (Cin-B2, -C2, Moc-C1, -D1, Scl-B1, C1, -D1, Spl-B1) und das allein stehende F2-Protein (F) von *Ciona intestinalis* (Cin-F2). Das **grau** umrandete Zentrum des Baums ist in Abb. 26 vergrößert dargestellt. Zur groben Orientierung innerhalb der Äste sind noch einige der Proteine an ihren jeweiligen Positionen angegeben. Weitere Erklärungen zu den Protein-Kurzbezeichnungen u. die Accession-Nummern finden sich im Anhang unter F2.

Im phylogenetischen IF-Protein-Baum werden die Typen I, II, V und VI in diskreten Ästen gruppiert. Daneben ist die Abgrenzung der IF-Proteine der Protostomier (Abb. 25 P-IF) im gemeinsamen Hauptast mit den Laminen (Abb. 25 V) zu erkennen (Weber et al., 1989; Erber et al., 1998). Diese Proteine ordnen sich, mit Ausnahme zweier IF-Proteine des Chaetognathen *Sagitta elegans* (Sel-IF), unabhängig von ihrer Funktion als neuronale- bzw. nicht-neuronale IF-Proteine in zwei Ästen an. Diese Auftrennung unterstützt die auf molekularen Untersuchungen basierende Unterteilung der nicht-Deuterostomier in Lophotrochozoa und Ecdysozoa (Adoutte et al., 2000; Abb. 25 „E“ und „L“ im P-IF-Ast). Die Lamine stellen den einzigen IF-Protein-Typ dar, der ubiquitär bei allen untersuchten Tierstämmen bis hin zu den Cnidariern auftritt (Erber et al., 1999).

Auf der Chordaten-Seite des Gesamtbaums fallen die jeweils separaten Äste der IF-Proteine der Cephalochordaten (C) *Branchiostoma lanceolatum* und *B. floridae* (Abb. 25 Äste AB CDE₂X und IF₁k₁E₁Y) sowie der Tunicaten (T) *Styela*, *Molgula* und *Ciona* auf (Abb. 25, Äste A, CDB und F). In ähnlicher Weise, doch jeweils direkt basal innerhalb der Keratin-Äste, gruppieren die K α - und K γ -Proteine der Agnathen *Eptatretus* und *Lampetra* (Abb. 25 grün-rote Äste, α und γ). Die Rod-Domänen der Typen III und IV haben im Vergleich mit den Keratin-Ästen I und II niedrigere Distanzen untereinander. Sie trennen sich erst nach der Abspaltung des Tunicaten-Astes T A, der die A1 bzw. A2-IF-Proteine der Ascidien *Styela plicata*, *Styela clava* und *Ciona intestinalis* enthält. Die Rod-Domänen der bisher ausschließlich von Tetrapoden bekannten Vertreter des Typ VI zeigen hohe Distanzen zu den anderen IF-Proteinsequenzen – und teilweise auch untereinander. Die als IF-Proteine der Typen I-IV beschriebenen Sequenzen von *Lampetra fluviatilis* ordnen sich basal, jedoch eindeutig nahe den jeweiligen Typen bzw. Subtypen an (Abb. 25 rote Äste innerhalb der Typen I, II und III/IV). Sie sollten sich demnach als ideale Außengruppen für die Erstellung phylogenetischer Stammbäume der jeweiligen IF-Typen bzw. Subtypen eignen.

Um die Sicherheit einer Verzweigung in einem phylogenetischen Baum zu überprüfen, wurden nach der sogenannten „Bootstrapping“-Methode 100 Varianten des Alignments auf ihre paarweisen Distanzwerte überprüft und für jede Variation ein molekularer Baum berechnet. Die Häufigkeit einer gewählten Verzweigung drückt sich im „Bootstrap“-Wert aus, der im vorliegenden Fall den maximalen Wert von 100 annehmen kann (entspricht 100%; vgl. Material und Methoden B 14.2). In Abb. 26 ist die zentrale Achse des Gesamtbaums noch einmal vergrößert mit den dazugehörigen Bootstrap-Werten (blaue Zahlen) dargestellt. Die jeweilige Einheit der Äste, die von der Hauptachse abzweigen, zeigt sich auch durch den Bootstrap-Wert ihrer ersten Verzweigung (rote Zahlen).

Anhand der sehr niedrigen Werte an der zentralen Achse wird deutlich, dass sich die IF-Protein-Äste der Cephalochordaten (C) CDE₂X und AB nicht eindeutig an einen der etablierten Hauptäste anschließen lassen. Vielmehr kommt es, bei Variation der Parameter zu einem „Springen“ dieser Gruppen an den basalen Positionen der Chordaten-IF-Typen, so dass Bootstrap-Werte von 21 nicht überschritten werden. Die Proteingruppe IF₁E₁Y₁k₁ von *Branchiostoma* wird dagegen zumindest in 36% der Fälle als Schwestergruppe zu den übrigen Typ I-Keratinen und γ -IF-Proteinen angesehen. Die Aufspaltungen der K α - und K γ -Proteine in Abgrenzung zu Typ II- bzw. Typ I-Proteinen in einem

2.1 Die IF-Typen der Chordaten

Ihre Entdeckung bei Cnidariern kennzeichnet die Lamine als die wahrscheinlich ursprünglichste IF-Protein-Klasse (Erber et al., 1999). Ihre funktionelle Bedeutung, nämlich die Bildung des Proteingerüsts der Kernlamina, wird durch einen hohen Konservierungsgrad der Sequenz im gesamten Tierreich bestätigt. Aus den Laminen haben sich offensichtlich die IF-Proteine der Protostomier entwickelt. Die 42 zusätzlichen Aminosäuren in der Rod-Domäne blieben bei diesen Proteinen enthalten (Weber et al., 1988; Weber et al., 1989; Erber et al., 1998). Der Verlust der sechs Heptaden stellte offenbar den Beginn der Aufspaltung in die IF-Typen der rezenten Chordaten dar. Ab hier werden zwei verschiedene Szenarien diskutiert. Konzept (1): möglicherweise war durch den Verlust der 42 Aminosäuren erst die Voraussetzung geschaffen, heterodimere Filamente aus zwei verschiedenen IF-Protein-Typen zu bilden, eine Eigenschaft, die alle IF-Proteintypen der Chordaten zumindest *in vitro* kennzeichnet (Steinert et al., 1999a; Steinert et al., 1999b). Die jeweiligen Partner dieser Heterodimere, sozusagen die Ur-Keratine, evolvierten in Typ I-artige und Typ II-artige aus Proteinen, die ihren Ursprung im Umfeld der Cephalochordaten-Radiation gehabt haben könnten. Aus Typ II-artigen Proteinen entstanden, sind die Typen III, IV und VI, den Verzweigungen im Gesamtbaum zufolge, die evolutiv jüngsten IF-Proteine. Sie wären dann sekundär, obwohl prinzipiell zur Heterodimerisierung befähigt, überwiegend wieder zur homodimeren IF-Bildung *in vivo* übergegangen.

Das Konzept (1) der IF-Protein-Evolution beantwortet jedoch nicht, warum die rezenten Urochordaten (Tunicaten) dem Gesamtbaum nach nur noch IF-Proteine besitzen, die den Typen III und IV näher stehen als den Keratinen. Vorausgesetzt, dass die Tunicaten den phylogenetisch ursprünglicheren Typ als die Cephalochordaten repräsentieren, worauf sowohl morphologische als auch molekulare Daten hinweisen (Garstang, 1928; Wada und Satoh, 1994; Wada, 1998; Cameron et al., 2000; Riemer et al., 2000; Shu et al., 2001), sind nach Konzept (2) die Keratine aus Typ III/IV-artigen Vorläufern entstanden und demnach ist ihre obligate Heterodimerbildung das jüngere Merkmal der IF-Evolution. In einem Vergleichsbaum ohne die IF-Proteine der Cephalochordaten und Tunicaten werden die Lamine und Protostomier-IF-Proteine den Typ III/IV und Typ VI-IF-Proteinen direkt benachbart angeordnet. Die isolierte Betrachtung der Evolution des Typ III/IV (siehe Diskussion D 2.4) unterstützt ebenfalls eher das Konzept (2).

Die Verzweigungen des Gesamtbaums (Abb. 25, Abb. 26) ergeben keinen Aufschluss darüber, ob die Proteine der Tunicaten oder der Cephalochordaten den ursprünglicheren Typ repräsentieren. Die große Distanz zu den IF-Proteinen der Vertebraten (inklusive der Neunaugen-Sequenzen) und die niedrigen Bootstrap-Werte im Gesamtbaum lassen jedoch am ehesten vermuten, dass sich die rezenten IF-Proteingruppen stammesgeschichtlich schon sehr früh und vergleichsweise rasch voneinander trennten. Die IF-Proteine der Tunicaten und Cephalochordaten werden stets getrennt gruppiert und zeigen keine auffälligen Sequenzähnlichkeiten (vgl. Tab. 8, 10 und 11). Die Aufklärung cytoplasmatischer IF-Proteinsequenzen von Echinodermaten und neue Sequenzdaten aus weiteren Klassen der Tunicaten (Thaliacea, Appendicularia) sowie Gattungen der Acranier (Asymmetron, Epigonichtys) sollten dazu beitragen, Licht in diese „Grauzone“ der Evolution der IF-Proteine zu bringen.

2.2 Die Typ I-Keratine des Neunauges – Frühformen von K18?

Während der Ontogenese von Säugern und Amphibien bildet das heterologe Paar der „S“-Keratine K8 und K18 die ersten Intermediärfilamente (Franz und Franke, 1986; Bader et al., 1988; Fouquet, 1991). Da sowohl bei Teleostern, Knorpelganoiden und Elasmobranchiern die orthologen Vertreter dieser beiden Keratine identifiziert wurden steht außer Frage, dass es sich innerhalb der Wirbeltierevolution um ein sehr ursprüngliches Expressionspaar handelt (Schaffeld et al., 1998; 2001a; 2001b; 2001c; 2001d).

Während ich bei *Lampetra fluviatilis* mit großer Wahrscheinlichkeit ein K8-orthologes Protein identifizieren konnte (siehe Diskussion D 2.3), kann keines der drei sequenzierten Typ I-Keratine ausschließlich anhand seiner Aminosäuresequenz als typisch K18-ortholog eingestuft werden. Alle K18 der bisher untersuchten gnathostomen Wirbeltiere ordnen sich in phylogenetischen Stammbäumen, die anhand multipler Alignments von Typ I-Keratinsequenzen erstellt wurden, in einem separaten Ast an, der gegenüber den übrigen Typ I-Keratinen von Fischen und höheren Wirbeltieren an basaler Position steht (Schaffeld et al., 1998). Die K18 zeigen dabei keine auffälligen konservierten Sequenzmotive, die sie exklusiv charakterisieren, sondern eine, die Gesamtsequenz umfassende höher liegende Ähnlichkeit untereinander, die um 5-10% größer ist als zu anderen Typ I-Keratinen der eigenen Spezies oder näher verwandten Arten (Tab. 8 E5-H8). Die drei Typ I-Keratine des Neunauges haben dagegen mit 70-90% Strukturidentität eine so große Ähnlichkeit untereinander (Tab. 8 A1-C3), dass sie sich lange nach der Abspaltung von den Gnathostomiern differenziert haben müssen.

Die Kennzeichnung eines der drei Keratine als Lfl-K18 beruht demnach nicht auf direkten Sequenzanalysen, sondern vielmehr auf der Tatsache, dass es das einzige identifizierbare IS-Keratin des Flussneunauges repräsentiert und in allen betreffenden Geweben mit Lfl-K8 koexprimiert wird. Lfl-K11 dagegen ist eindeutig ein IE-Keratin und das ubiquitär auftretende Lfl-K10 wird mengenmäßig überwiegend in epidermalen Geweben exprimiert. Bei dem nicht sequenzierten Typ I-Keratin aus dem Bereich des Saugmundes läßt sich zwar nicht ausschließen, dass es sich um ein spezialisiertes „S“-Keratin handelt, die Expression von Lfl-K8 wurde jedoch im Saugmund nicht beobachtet.

Unabhängig von dieser rein biochemischen Definition ist es interessant, dass im Bereich des Rod-Domänenvergleichs in der Identitätsmatrix der Tab. 8 die Typ I-Keratine von *Lampetra* zum K18 des Katzenhais (Sst-K18) die höchsten Werte aufweisen (E1-E3). Die Unterschiede im Vergleich zu anderen Keratinen der Tabelle sind jedoch nicht viel größer als die berechnete Standardabweichung und demnach nicht signifikant. Trotz der hohen Identitäten der Typ I-Keratine des Neunauges untereinander scheint Lfl-K18 das am wenigsten abgeleitete Protein im Vergleich mit den anderen Proteinen der Tab. 8 zu sein. Auch hier sind jedoch die Abstände zu K10 und K11 äußerst gering.

Tab. 8 Identitätsmatrix der Typ I-Keratine. Die Identitäten wurden nach dem Modell „p-distance“ berechnet und sind in Prozent Identität angegeben. Die linke untere Hälfte ist ein Vergleich über den gesamten Sequenzbereich der Keratine, die rechte obere Hälfte bezieht sich nur auf den Bereich der konservierten helikalen Rod-Domäne. Die Werte für die Standardabweichungen liegen zwischen 1,7% und 2,9%. Verglichen wurden die drei Neunaugen-Typ I-Keratine Lfl-K10, Lfl-K11 und Lfl-K18 mit den Typ I-Keratinen von Katzenhai (Sst-K18), Forelle (Omy-K18, Omy-K10, Omy-K11), Krallenfrosch (Xla-K18, Xla-XK70), Huhn (Gga-K19) und Mensch (Hsa-K18, Hsa-K20, Hsa-KHA1 (Haar-Keratin)), sowie Vertreter der biochemisch als Typ I klassifizierten IF-Proteine von Tunicaten (Sc1-D1) und Cephalochordaten (Bla-E1). Des Weiteren wurden die Typ I-keratinartigen γ -Proteine Lfl-K γ 3 und Est-K γ mitvergleichen. Weitere Angaben zu den Protein-Kurzbezeichnungen u. die Accession-Nummern finden sich im Anhang unter F2. Identitätsfelder der Matrix, die die Typ I-Keratine des Flussneunauges betreffen sind grau unterlegt. Werte, die zwei Sequenzen von *Lampetra fluviatilis* direkt miteinander vergleichen sind zusätzlich rot hervorgehoben.

Typ I-Identitäten GE-SAMT	ROD																		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	
	Lfl-K10	Lfl-K11	Lfl-K18	Aba-K5d2	Sst-K18	Omy-K18	Xla-K18	Hsa-K18	Xla-XK70	Omy-K10	Omy-K11	Gga-K19	Hsa-K20	Hsa-K HA1	Bla-E1	Lfl-K γ 3	Est-K γ	Sc1-D	
1	Lfl-K10	-/-	83,1	89,9	47,7	52,8	48,9	48,7	50,8	45,9	45,9	47,9	49,8	40,7	45,0	37,7	32,0	30,2	34,5
2	Lfl-K11	71,3	-/-	83,4	47,4	51,5	49,8	48,4	48,9	47,2	45,9	46,3	48,9	42,0	44,0	37,0	30,1	30,2	33,2
3	Lfl-K18	86,8	77,3	-/-	49,3	51,8	49,5	49,7	50,8	47,2	48,2	48,9	51,1	42,7	45,6	39,3	32,7	29,9	34,9
4	Aba-K5d2	45,1	45,3	46,9	-/-	46,9	47,5	43,1	42,3	45,4	45,4	45,2	47,1	42,2	41,2	36,3	30,9	31,0	28,8
5	Sst-K18	42,3	41,8	45,2	41,4	-/-	57,5	59,3	56,2	51,5	46,9	52,8	53,1	49,8	44,3	33,1	31,7	29,9	37,8
6	Omy-K18	40,5	40,1	44,4	40,0	49,6	-/-	58,0	60,1	51,5	49,2	54,1	50,2	49,5	43,0	33,4	32,0	26,9	34,9
7	Xla-K18	39,1	38,9	43,6	37,7	54,0	53,5	-/-	65,8	51,0	47,4	50,3	52,9	48,0	46,7	30,3	31,1	28,3	35,0
8	Hsa-K18	40,6	39,7	43,8	36,8	51,0	54,0	61,7	-/-	50,5	47,2	52,1	51,5	48,9	48,2	32,5	32,2	27,5	35,4
9	Xla-XK70	36,7	38,0	42,2	36,7	46,2	44,8	46,6	46,4	-/-	54,5	54,7	61,4	51,6	50,0	31,1	31,7	27,9	34,5
10	Omy-K10	41,5	40,3	44,6	40,5	40,5	44,3	43,8	42,1	47,5	-/-	63,2	59,4	50,0	48,4	31,1	30,7	27,3	31,9
11	Omy-K11	39,6	37,3	44,5	38,4	43,9	47,0	44,8	46,0	48,8	58,1	-/-	58,3	51,8	49,5	32,1	33,0	30,2	35,9
12	Gga-K19	43,2	41,9	46,0	43,4	44,8	43,4	47,3	45,6	53,2	51,4	50,4	-/-	55,8	53,6	34,1	33,0	29,5	38,2
13	Hsa-K20	33,3	35,2	38,4	36,5	43,7	45,5	43,5	45,4	46,3	44,1	46,2	49,4	-/-	50,3	29,8	31,7	28,9	32,6
14	Hsa-K HA1	36,5	35,0	40,9	34,7	36,9	34,7	37,7	40,1	40,1	40,8	38,7	45,1	41,0	-/-	29,8	32,4	30,8	33,6
15	Bla-E1	34,4	35,7	36,9	33,3	28,8	29,1	28,0	28,6	28,2	31,3	29,6	33,3	26,7	26,0	-/-	28,5	25,1	30,1
16	Lfl-K γ 3	29,4	28,0	30,7	29,0	26,2	27,7	26,9	28,5	25,1	26,7	26,9	29,8	26,0	24,7	27,9	-/-	43,3	33,6
17	Est-K γ	27,5	28,3	29,2	26,5	24,6	23,5	25,7	24,4	23,6	25,2	24,9	26,7	23,3	24,3	24,4	40,7	-/-	28,8
18	Sc1-D1	28,8	28,0	32,0	26,6	32,1	32,4	32,0	31,9	30,9	29,0	30,4	34,0	30,2	26,3	26,5	29,6	25,4	-/-

Die Typ I-Proteine von *Lampetra* sind eindeutig mit den anderen Wirbeltier-Keratinen näher verwandt als mit den keratinartigen Proteinen von *Styela*, *Branchiostoma* und den γ -IF-Proteinen der Cyclostomaten. Selbst zu den trichocytären Haar-Keratinen der Säuger (Hsa-K_HA1) sind die Identitätswerte im Bereich der Rod-Domänen mit ca. 45% kaum niedriger als zu den Typ I-Keratinen der Fische (Tab. 8 N1-N3).

Die hohe Identität der Typ I-Keratine des Flussneunauges untereinander könnte das Resultat von relativ spät in der Evolution der Agnathen aufgetretenen Genduplikationen sein. Die altertümlichen Formen der Agnathen, bspw. Vertreter der Ostracodermen, hatten möglicherweise nur ein Typ I-Keratin; das Ur-K18-orthologen Keratine der gnathostomen Wirbeltiere könnte aus dieser Wurzel stammen. Spezielle Keratine von Stör (*Acipenser baeri*, Aba-K5d2) und Flösselhecht (*Polypterus*

senegalus, Pse-S70 und Pse-K13) sind dabei möglicherweise sehr stark abgeleitete Relikte dieser Entwicklung (Tab. 8 und Abb. 27; Haberkamp et al., 2001; Höffling, 2001).

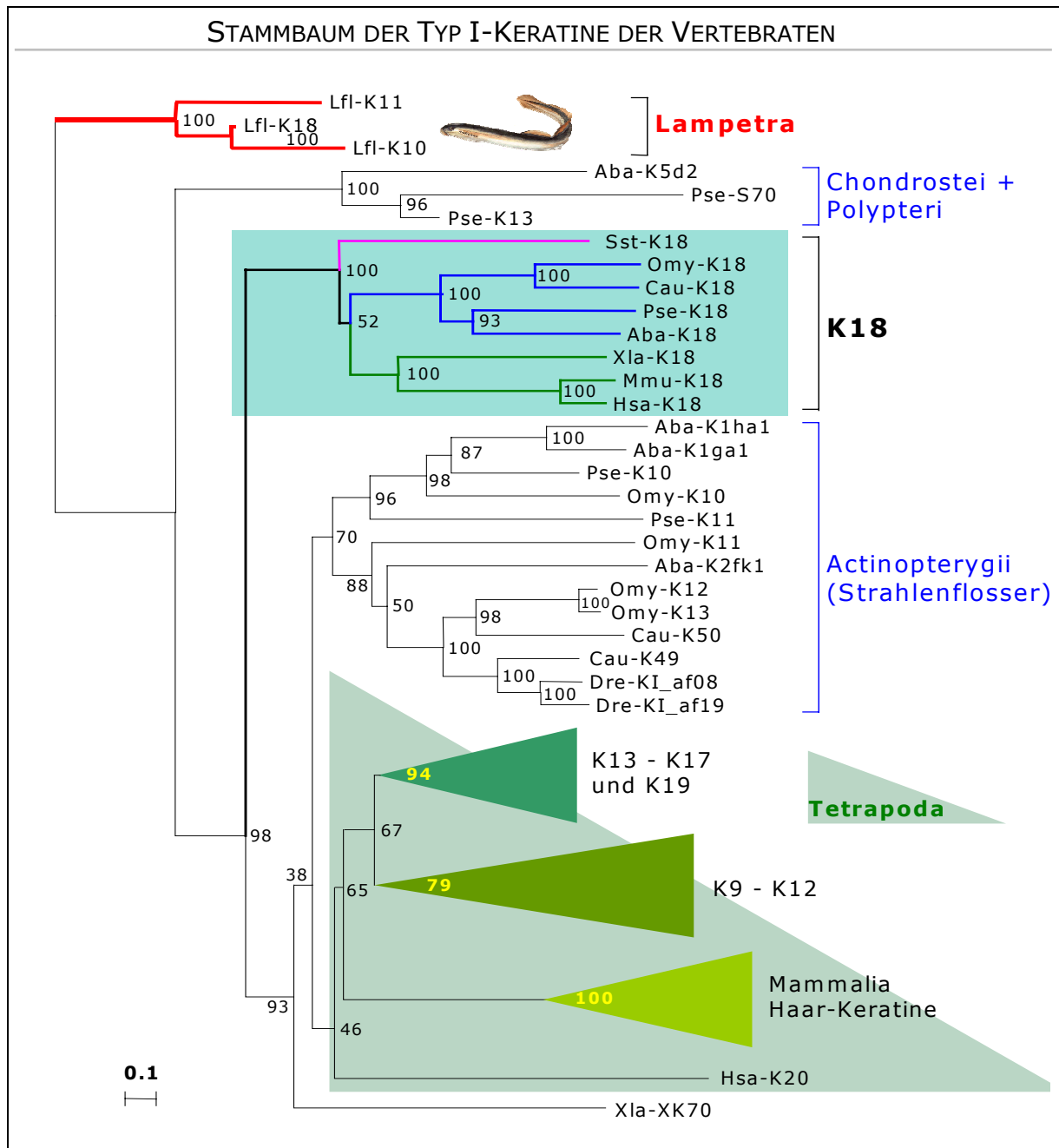


Abb. 27 Evolution der Typ I-Keratine. Phylogenetischer Baum von 71 Typ I-Keratinen der Vertebraten nach einem multiplen Vergleich der gesamten Sequenzen. Die drei Typ I-Keratine des Flussneunauges sind als Außengruppe definiert. Die Distanzmarkierung unten links beschreibt 0,1 Aminosäuresubstitutionen pro Position (korrigiert nach JTT). Die drei Keratine des Neunauges sind mit **rot**en Ästen hervorgehoben, das K18 des Katzenhais (Sst) **rosa**. Keratine der Strahlenflosser sind mit **blauen** Ästen gezeichnet bzw. mit **blauer** Taxa-Bezeichnung versehen, die der Landwirbeltiere (Tetrapoda) entsprechend **grün**. Die K18-orthologen Proteine der gnathostomen Wirbeltiere sind blaugrün unterlegt. Monophyletische Gruppen der Tetrapoden-Typ I-Keratine wurden aus Platzgründen zu grünfarbenen Dreiecken zusammengefasst. Bei den Proteinen Pse-S70 und Pse-K13 des Flösselhechts sind die für die Head-Domänen codierenden cDNAs, bei Pse-K13 zusätzlich auch die für die Tail-Domäne codierende cDNA noch nicht sequenziert worden. Erklärungen zu den Protein-Kurzbezeichnungen u. die Accession-Nummern finden sich im Anhang unter F2.

In einem Stammbaum, der die Typ I-Keratine der Vertebraten in ihrem Distanzverhältnis zueinander darstellt, kann bei der Wahl der Außengruppe nicht zwischen den drei Proteinen des Flussneunauges differenziert werden. Zusammen bilden sie jedoch ein ideales Bezugssystem, um die Verwandtschaftsverhältnisse der Typ I-Keratine der Wirbeltiere darzustellen (Abb. 27).

Auch in diesem Baum ordnen sich die K18-orthologen Proteine der gnathostomen Wirbeltiere in einem gemeinsamen Ast an, dessen Verzweigungen den etablierten Wirbeltierstammbaum separat abbilden und bestätigen. Auffällig ist hier jedoch der niedrige Bootstrap-Wert an der Verzweigung der Tetrapoden und Actinopterygii (Strahlenflosser). Die Sequenzen der K18-orthologen Typ I-Keratine von Lungenfischen und Quastenflosser dürften diesen Wert verbessern.

Das die K18-orthologen Proteine vermutlich nicht die ursprünglichsten Typ I-Keratine der Vertebraten darstellen, wird neben den Neunaugensequenzen auch durch drei spezielle Typ I-Keratine von Stör (Aba-K5d2, vgl. Tab. 8) und Flösselhecht (Pse-S70 und Pse-K13) erkennbar, die zwischen *Lampetra* und dem K18-Ast angeordnet werden (Haberkamp et al., 2001; Höffling, 2001)

Die übrigen Typ I-Keratine der Actinopterygii (Strahlenflosser) spalten sich in zwei Hauptäste auf. Diese trennen u. a. die Forellenkeratine in die IE- (Omy-K11, Omy-K12 und Omy-K13) und IS-Keratine (Omy-K10; Schaffeld et al., 2001c).

Mit Ausnahme des Keratins Xla-XK70 des Krallenfroschs *Xenopus laevis* (Winkles et al., 1985) sind die nicht K18-orthologen Typ I-Keratine der Tetrapoden nach diesem Stammbaum monophyletischen Ursprungs. Aufgrund fehlender orthologer Sequenzen zu XK70 und auch zum Keratin K20 vom Menschen (Hsa-K20; Moll et al., 1993) sind die Verzweigungen in diesem Bereich aber noch ungesichert. Die restlichen Typ I-Keratine der Tetrapoden gruppieren in drei diskreten Ästen. Dabei stehen die sauren Haarkeratine der Mammalia (Säugetiere) den Keratinen K9 bis K12 der Säugetiere inklusive weiterer amphibischer Keratine einerseits und den bislang bekannten K13 bis K17- und K19-orthologen Keratinen der Amnioten andererseits gegenüber.

Auch wenn innerhalb der Typ I-Keratin-Evolution noch einige Unklarheiten bestehen, ist die jeweilige Abstammung der einzelnen Proteine trotz hoher Komplexität und Diversität der monophyletischen Gesamtgruppe schon in weiten Zügen recht deutlich. Die drei nunmehr bekannten Typ I-Keratinsequenzen des Flussneunauges tragen als optimale Außengruppe zu diesem sich verdichtenden Gesamtbild bei.

2.3 Die Typ II-Keratine des Neunauges– K8 als Leitmotiv der Typ II-Evolution

Von den sieben sequenzierten „echten“ Keratinen des Neunauges ist vermutlich nur das in Epithelien des Darms und der Kieme exprimierte Keratin Lfl-K8 ein orthologes Protein zu bekannten Keratinen gnathostomer Wirbeltiere. Die K8 stellen demnach derzeit das einzige System orthologer Keratine dar, das sich über den gesamten Unterstamm der Vertebraten erstreckt.

Die Verwandtschaft der K8-orthologen Proteine zeigt sich neben der obligaten Expression in einfachen Epithelien und der Koexpression mit K18 vor allem in einem hochkonservierten Motiv am

C-terminalen Ende der Primärsequenz (Abb. 28). Dieses Motiv tritt bei keinem bisher sequenzierten nicht-K8-orthologen Typ II-Keratin auf, aber bei allen bekannten Vertretern der Typ III-IF-Proteine, den A- und D-IF-Proteinen der Tunicaten, bei zwei $K\gamma$ -Proteinen des Neunauges (vgl. D3) und deutlich weniger konserviert auch bei vielen Typ I-Keratinen (inklusive der K18-orthologen). Dieses typübergreifende Motiv ist damit auch ein Indiz für die monophyletische Abstammung der IF-Typen I-IV und gleichzeitig ein Hinweis für die Ursprünglichkeit der K8 innerhalb der Typ II-Keratine.

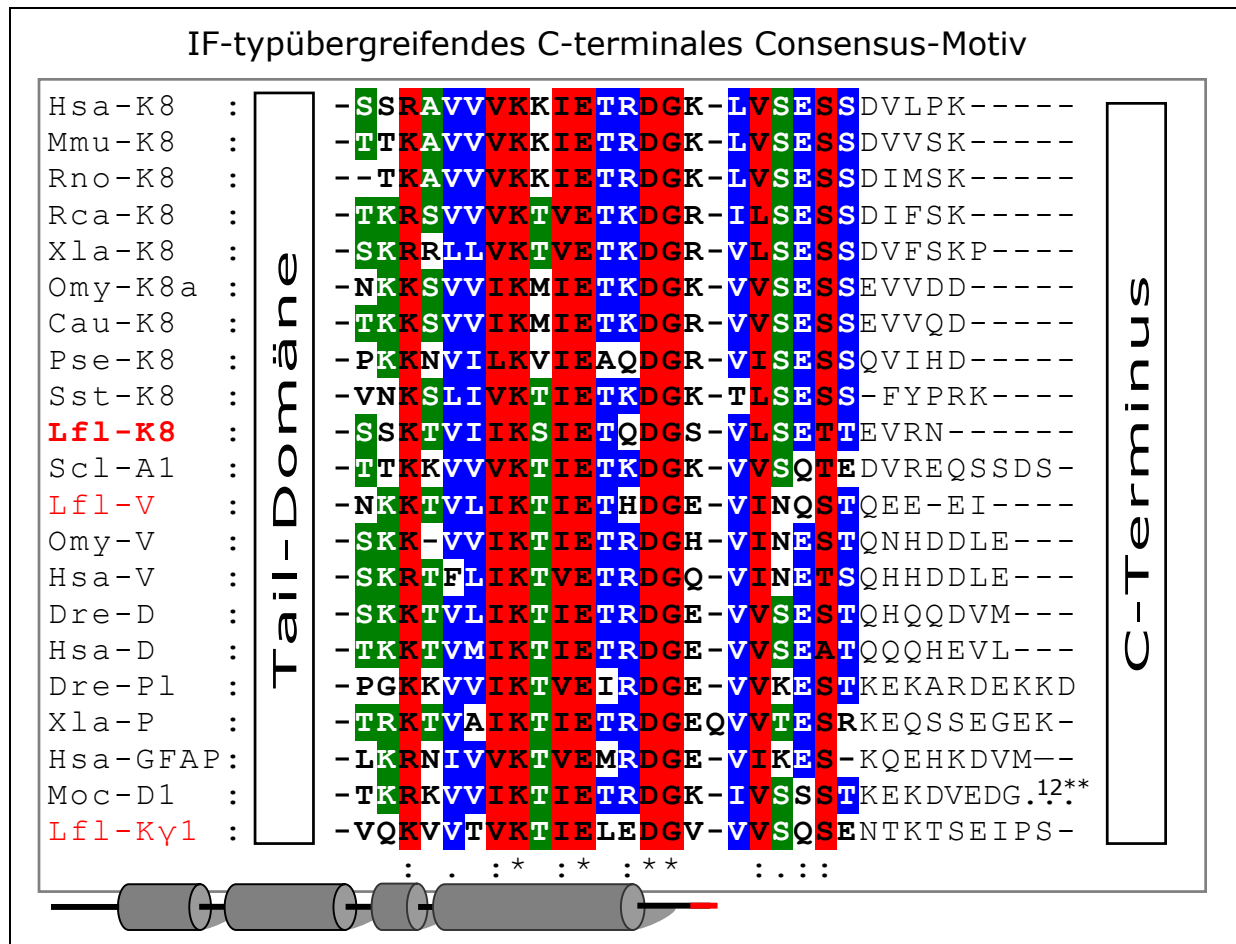


Abb. 28 Konserviertes Motiv der K8-orthologen Proteine und der Typ III-IF-Proteine in der Tail-Domäne kurz vor dem C-Terminus. Dargestellt ist der betreffende Ausschnitt eines multiplen Sequenzvergleichs der bisher bekannten K8-orthologen Proteine der Wirbeltiere sowie verschiedener Typ III-Vertreter, $K\gamma$ 1 des Neunauges und der IF-Proteine A1 bzw. D1 der Ascidien *Styela clava* (Sc1) und *Molgula oculata* (Moc). (**) Dass D1-Protein der Ascidie weist zwölf zusätzliche Aminosäurepositionen vor dem C-Terminus auf (nicht dargestellt). Die Sequenzen stammen von Mensch, Hsa; Maus, Mmu; Ratte Rno; Ochsenfrosch, Rca; Krallenfrosch, Xla; Forelle, Omy; Goldfisch, Cau; Flösselhecht, Pse; Katzenhai, Sst; Zebraärbling, Dre und Neunauge, Lfl. (V: Vimentin, D: Desmin, Pl: Plasticin, P: Peripherin und GFAP: saures Gliafilament-Protein). Weitere Erklärungen zu den Protein-Kurzbezeichnungen u. die Accession-Nummern finden sich im Anhang unter F2. Sterne (*), Doppelpunkte (:) und einfache Punkte (.) unter den Sequenzen zeigen verschiedene Konservierungsgrade der Aminosäuren in allen dargestellten Sequenzen an. Zusätzlich wurden einzelne konservierte Aminosäurepositionen anhand der „Dayhoff PAM 120 Matrix (Dayhoff et al., 1979) farblich hervorgehoben. Rote Markierungen entsprechen einem 100%igen Konservierungsgrad in allen Sequenzen, blauer Hintergrund bedeutet konservierte Aminosäuren in mind. 80% der Sequenzen und grüne Hervorhebung zeigt konservierte Aminosäuren in mind. 60% der dargestellten Sequenzen an. Eine rote Farbmarkierung im Domänen-Modell am unteren Bildrand zeigt die Position des Ausschnitts im IF-Protein an.

Daneben gibt es in der Head-Domäne der K8 nahe des N-Terminus ein kürzeres konserviertes Motiv mit der Sequenz <FSS-S(Y)>. Diese kurze Sequenz tritt zwar auch in vielen anderen Typ II-Keratinen auf, nicht jedoch an dieser Position innerhalb der bekannten Sequenzen der Typ II-Keratine K1-K3 des Neunauges. Wiederum läßt sich eine mögliche Verbindung herstellen zu dem in den meisten Typ III- und Typ IV IF-Proteinen an gleicher Stelle vorhandenen und für die Filamentbildung obligaten (Herrmann, 1995) Motiv mit der Sequenz <(S)SSYR>.

Ein direkter Vergleich der Distanzwerte der bekannten K8-orthologen IF-Proteine untereinander zeigt eine bemerkenswerte Konstanz bezüglich seiner Evolutions-Geschwindigkeit (Tab. 9).

Tab. 9 Distanzwerte der K8-orthologen Typ II-Keratine von **Kieferlosen** (Neunauge, Lfl), **Knorpelfischen** (Katzenhai, Sst) **Strahlenflosser** (Flösselhecht, Pse; Forelle, Omy und Goldfisch, Cau) sowie **Landwirbeltiere** (Molch, Nvi; Krallen u- Ochsenfrosch, Xla, Rca; Mensch, Hsa; Ratte, Rno und Maus, Mmu). Weitere Erklärungen zu den Protein-Kurzbezeichnungen u. die Accession-Nummern finden sich im Anhang unter F2. Die Zahlen der Tabelle geben die Anzahl der Aminosäuresubstitutionen pro Position an (korrigiert nach JTT). Der Sequenz des Wassermolchs *Notophthalmus viridescens* (Nvi) fehlt noch ein Teil der Head-Domäne. Unterschiedliche Distanz-Grade sind durch abgestufte Grauschattierungen des Hintergrundes bzw. der Schriftfarbe gekennzeichnet. Diese Matrix stellt die Grundlage für den phylogenetischen Baum K8-orthologer Proteine der Abb. 29 c dar.

Typ II K8 Distanzen (nach JTT)													Distanzen
1	Mmu	0,00											0,00
2	Rno	0,10	0,00										< 0,24
3	Hsa	0,16	0,17	0,00								0,25-0,49	
4	Rca	0,62	0,58	0,55	0,00						0,50-0,74		
5	Xla	0,64	0,64	0,63	0,28	0,00					0,75-0,99		
6	Nvi	0,63	0,62	0,58	0,48	0,53	0,00				1,00-1,24		
7	Cau	0,70	0,71	0,72	0,70	0,78	0,82	0,00			> 1,25		
8	Omy	0,74	0,75	0,73	0,70	0,73	0,78	0,26	0,00				
9	Pse	0,80	0,79	0,77	0,80	0,80	0,89	0,67	0,64	0,00			
10	Sst	1,24	1,22	1,28	1,15	1,27	1,23	1,24	1,21	1,24	0,00		
11	Lfl	1,37	1,38	1,41	1,39	1,39	1,40	1,30	1,29	1,27	1,49	0,00	
		Mmu	Rno	Hsa	Rca	Xla	Nvi	Cau	Omy	Pse	Sst	Lfl	

So weist das K8 des Neunauges (Lfl) zu allen K8-orthologen Keratinen ähnlich hohe Distanzwerte auf, wobei zum K8 des Katzenhais (Sst) die größte Distanz besteht. Dieses wiederum hat kleinere, jedoch genauso konstante Werte zu allen K8-orthologen Keratinen der Strahlenflosser und Tetrapoda. Die Wertekonstanz trifft weitgehend auch für die übrigen Distanzen der K8 von Flösselhecht (Pse), Teleosteen (Omy, Cau), Amphibien (Nvi, Xla, Rca) und Säugetieren (Hsa, Rno, Mmu) zu. Demnach ist in Bezug auf den Zeitpunkt der Trennung vom gemeinsamen K8-Vorläufer der gesamten Vertebratengruppe in jeder Unterklasse ein relativ gleichbleibender Grad an Veränderung in der jeweiligen K8-Sequenz erfolgt (Abb. 29). Dies steht wahrscheinlich im unmittelbaren Zusammenhang mit der elementaren Funktion im Organismus bzw. in dessen Entwicklung und den damit verbundenen selektiven Mechanismen (Franz und Franke, 1986; Bader et al., 1988; Fouquet, 1991; Galou et al., 1997; Hesse et al., 2000; Tamai et al., 2000; Toivola et al., 2001).

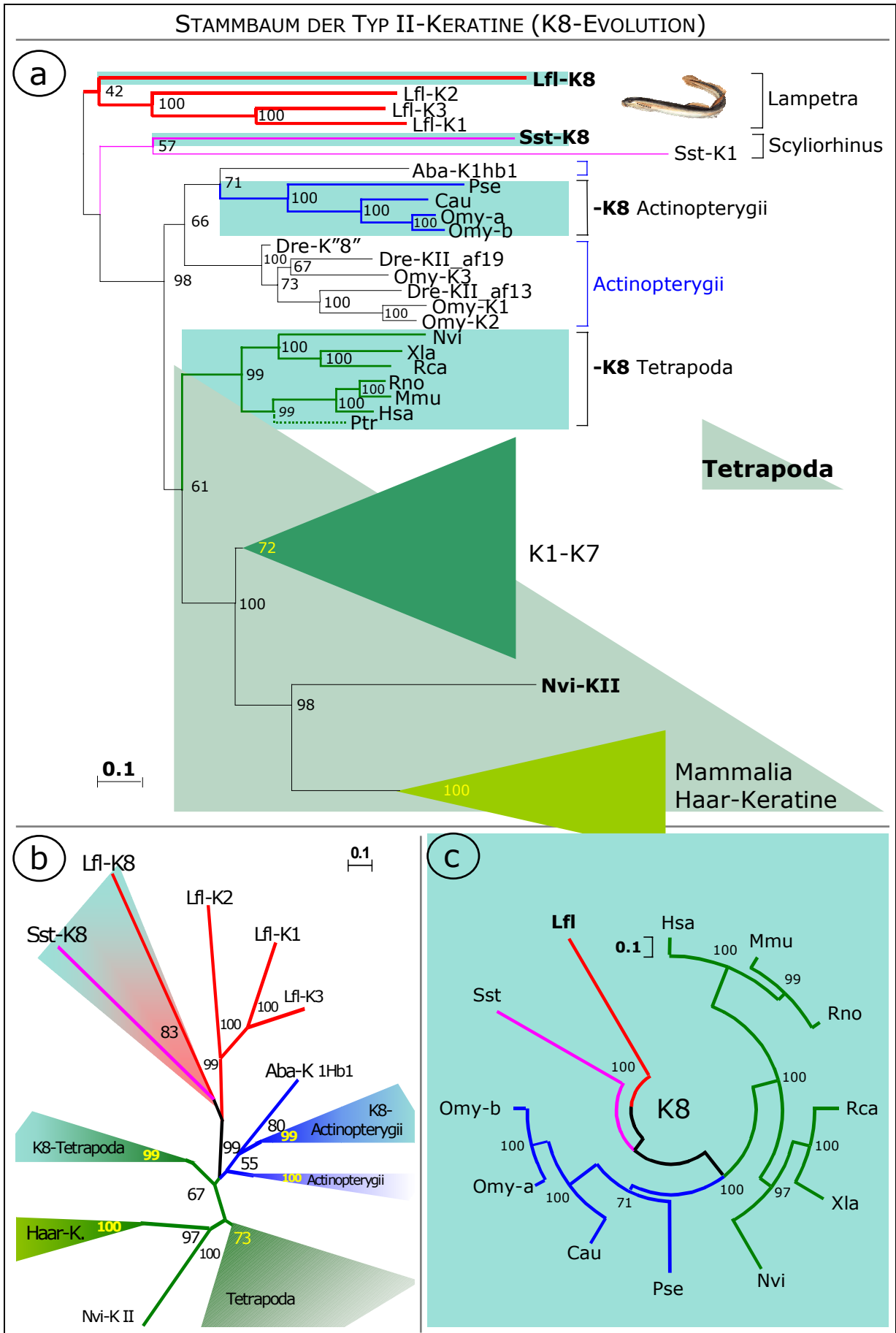


Abb. 29 Legende: siehe nächste Seite

Abb. 29 Evolution der Typ II-Keratine. **a**: Phylogenetischer Baum von 60 Typ II-Keratinen der Vertebraten. Die vier Typ II-Keratine des Flussneunauges bilden die Außengruppe. **b**: Dergleiche Baum, vereinfacht, ohne das Protein Sst-K1 in radialer Darstellung **c**: Baum der bekannten K8-orthologen Proteine in kreisförmiger Anordnung mit K8 von Neunauge als Außengruppe. Alle drei Bäume wurden nach multiplen Alignments der gesamten Sequenzen erstellt. Die Distanzmarkierungen unten links in **a**, oben rechts in **b** bzw. im oberen Kreisbereich in **c** beschreiben 0,1 Aminosäuresubstitutionen pro Position (korrigiert nach JTT). Die Keratine des Flussneunauges (*Lampetra*) werden mit **roten** Ästen dargestellt, die des Katzenhais (*Scyliorhinus stellaris*) in **rosa**. Keratine der Strahlenflosser (Actinopterygii) sind mit **blauen** Ästen gezeichnet (K8) bzw. mit **blauer** Taxa-Bezeichnung versehen, die der landlebenden Wirbeltiere (Tetrapoda) entsprechend **grün**. K8-orthologe Proteine sind blaugrün unterlegt. Monophyletische Gruppen sind aus Platzgründen teilweise zu farbigen Dreiecken zusammengefasst. Die hier dargestellten Bäume wurden ohne das K8 des Kaninchenkänguruhs *Potorous tridactylus* errechnet, da diesem Protein noch die Coil 2B der Rod-Domäne sowie die gesamte Tail-Domäne fehlt (Bottger und Lane, 1994). In Vergleichsbäumen ordnet es sich jedoch eindeutig und ohne Änderung der Bootstrap-Werte in den K8-Ast der Tetrapoden ein. Seine Position ist durch eine gestrichelte Linie im Gesamtbaum in **a** dargestellt (Ptr). Den verwendeten Proteinen K2 des Neunauges, K8 und KII des Wassermolchs *Notophthalmus viridescens* (Nvi u. Nvi-KII) fehlt jeweils ein Teil der für die Head-Domäne codierenden Sequenz. Dem Protein K⁸ des Zebrabärblings *Danio rerio* (Dre) fehlen noch die für die komplette Head-Domäne und ein Teil der Tail-Domäne codierenden Sequenzen. Weitere Erklärungen zu den Protein-Kurzbezeichnungen u. die Accession-Nummern finden sich im Anhang unter F2.

Die konkrete Anordnung der K8-Vertreter in einem phylogenetischen Baum, der auf einem multiplen Alignment aller bekannten Polypeptidsequenzen der Typ II-Keratine basiert, ist nach diesen Befunden überraschend (Abb. 29 a), da die K8-Proteine nicht wie die K18-Proteine (vgl. Abb. 27) in einem eigenen Ast angeordnet werden: ausgehend von den mit einem sehr niedrigen Bootstrap-Wert gemeinsam gruppierten Keratinen des Neunauges als gewählte Außengruppe zweigen zuerst die beiden Keratine des Katzenhais ab (Sst). Dem folgt ein größeres Aufspaltungsereignis, in dessen weiteren Verlauf sich die K8 der Strahlenflosser und die meisten der übrigen Strahlenflosser-Keratine zum einen und die K8 der Tetrapoden und alle sonstigen Tetrapoden-Keratine zum anderen in je zwei Schwestergruppen aufteilen. Die nicht K8-orthologen Keratine der Tetrapoden trennen sich daraufhin noch einmal in cytoplasmatische Keratine und die basischen Haarkeratine der Mammalia. Basal zu den Haarkeratinen wird interessanterweise ein Keratin des Wassermolchs *Notophthalmus viridescens* angeordnet (Nvi-KII; Ferretti et al., 1991).

Aufgrund der Annahme, dass nicht die relativ konstant evolvierenden K8-orthologen Proteine sich mehrmals neu und konvergent entwickelt haben können, muss von einer konvergenten Entwicklung der anderen IIE/IIS-Keratine der Agnathen, Knorpelfische, Strahlenflosser sowie der Tetrapoden ausgegangen werden. Das ist vor allem aus der Erwartung einer konvergent verlaufenden Evolution der Heterodimere bildenden Typ I- und Typ II-Keratine der gnathostomen Wirbeltiere erstaunlich: während die einen eine monophyletische Schwestergruppe zu den K18-orthologen IF-Proteinen bilden, scheinen die anderen in jeder evolutiven Organisationsstufe der Vertebraten einer Neuentwicklung aus K8 zu unterliegen (Schaffeld et al., 1998). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass die langen Glycin-reichen Head- und Tail-Domänen der IIE-Keratine vielleicht mehr die spezifischen Eigenschaften des gebildeten Intermediärfilaments bestimmen als die ihrer IE-Partner. Infolgedessen waren sie möglicherweise zu angepasst für die sich im Verlauf der Wirbeltierevolution mehrere Male radikal abgewandelten epidermalen Gewebe. Eine Sequenzanalyse

der Typ II-Keratine von Lungenfischen bzw. des Quastenflossers *Latimeria* könnten künftig zum Verständnis der Typ II-Evolution beitragen.

Die K8-Keratine von Neunauge und Katzenhai werden in dem Typ II-Gesamtbaum nicht miteinander gruppiert und zu dem sehr stark abgeleiteten IIE-Keratin Sst-K1 des Katzenhais (Schaffeld et al., 1998) ist bis jetzt keine orthologe Proteinsequenz verfügbar. Es kommt bei Sst-K1 und Sst-K8 vermutlich zu einer sogenannten „long branch attraction“, die besagt, dass in phylogenetischen Analysen durch die verwendeten Algorithmen die Tendenz besteht, Einheiten mit langen Distanzästen zusammen und basal zu gruppieren (Felsenstein, 1978; Hillis et al., 1994). In einem Vergleichsbaum ohne Sst-K1 werden Lfl-K8 und Sst-K8 gemeinsam den drei anderen Keratinen von *Lampetra* gegenübergestellt (Abb. 29 b), allerdings könnte auch zwischen Sst-K8 und Lfl-K8 eine „long branch attraction“ vorliegen (siehe Tab. 9). Eine Außengruppe ist in diesem Baum nicht mehr eindeutig definierbar, da nicht klar ist, ob Lfl-K8 oder die drei anderen Typ II-Keratine des Neunauges den ursprünglichen Typ repräsentieren. Die meisten Bootstrap-Werte verbessern sich in diesem Baum leicht gegenüber dem Typ II-Gesamtbaum mit Sst-K1. Für mehr Klarheit in diesem Bereich dürften weitere Typ II-Keratinsequenzdaten von Vertretern der Chondrichthyes und Agnathen sorgen.

Werden die bekannten K8-orthologen Typ II-Keratine isoliert und mit Lfl-K8 als Außengruppe betrachtet (Abb. 29 c) entsteht ein dem K18-Ast in Abb. 27 vergleichbarer K8-Baum. Dieser zeichnet mit hohen Bootstrap-Werten die aus morphologischen und fossilen Daten ermittelten Abstammungsverhältnisse der Wirbeltiere nach.

2.4 Die IF-Proteine vom Typ III- und Typ IV und der Ursprung des Vimentins

Die IF-Protein-Typen III und IV bilden zusammen höchstwahrscheinlich eine monophyletische Gruppe und haben strukturelle Ähnlichkeit mit den A-IF-Proteinen der Tunicaten-Klasse Ascidiacea (vgl. Abb. 25, Abb. 26 und Tab. 10; Riemer und Weber, 1998; Wang et al., 2000). Die anderen bisher bekannten IF-Proteine der Ascidien (B-F) haben sich möglicherweise vor der Abspaltung der Typ III/IV-Proteine aus derselben Wurzel entwickelt. Hier könnte auch der Ursprung IF-Proteine des Typs VI zu suchen sein, mit denen zumindest die Typ III-Proteine *in vitro* Heterodimere bilden können (Abb. 25 und Abb. 26; Steinert et al., 1999a; 1999b).

Mit den K8-orthologen Typ II-Keratinen teilen die meisten Typ III-Proteine ein hochkonserviertes Motiv in der Tail-Domäne (siehe Abb. 28). Ungeklärt ist, ob die Typ III/IV-Proteine phylogenetisch älter als die Keratine sind. Ihre Nähe zu den Tunicaten-Proteinen indiziert zwar die Typ III/IV-Proteine als ursprünglich, doch wurde bis jetzt noch kein IF-Protein eines Acraniers sequenziert, das dieses Konzept überzeugend unterstützt.

Aus dem IF-Gesamtbaum in Abb. 25 geht hervor, dass Vimentin, Desmin und das Neurofilament-Protein des Neunauges nicht basal vom Typ III/IV-Ast abzweigen, wie das bei den Keratinen der Fall ist, sondern innerhalb von Typ III bzw. Typ IV angeordnet werden. Die Trennung der Typ III- von den

Typ IV-Proteinen war demnach schon vor der Aufspaltung in Agnatha und Gnathostomata vollzogen. Es existierten wahrscheinlich auch schon verschiedene Subtypen wie bspw. die Neurofilament-Proteine, ein weiterer Hinweis für die Ursprünglichkeit der Gruppe III/IV. Die IF-Proteinsequenzen des Flussneunauges können deswegen nicht als Außengruppe für die Darstellung der gesamten Typ III- bzw. Typ IV-Evolution verwendet werden, sie eignen sich jedoch optimal als Außengruppe für die phylogenetische Betrachtung einzelner Subtypen wie bspw. der Desmine.

Die niedrigen Distanz- bzw. hohen Identitätswerte der verglichenen Rod-Domänen innerhalb der Gruppe III/IV (Abb. 25 und Tab. 10) dürfen nicht darüber hinwegtäuschen, dass die Tail-Domänen der Typ IV-Proteine sich so sehr in Länge und Primärstruktur von denen der Typ III-Proteine unterscheiden, dass ein direkter Vergleich in diesem Bereich keine auffälligen Ähnlichkeiten zeigt. Die A- (und D)-Proteine der Tunicaten zeigen in ihrem Tail eine den Typ III-Proteinen strukturverwandte Sequenz (Abb. 28), haben sich jedoch offensichtlich vor der Aufspaltung von Typ III und Typ IV von der gemeinsamen Entwicklung getrennt (Abb. 25, Abb. 26). Somit wäre es denkbar, dass sich die Typ IV-Proteine aus einem Gen entwickelt haben, bei dem die komplette Tail-Domäne deletiert wurde und später neu evolvierte. Das Neurofilament-Protein des Flussneunauges (LF1-NF_L) belegt als erstes bekanntes Typ IV-Protein mit sehr kurzer Tail-Domäne, dass „schwanzlose“ Vertreter dieser IF-Klasse existieren. Dies ist eine strukturelle Besonderheit angesichts der sehr langen Tail-Domänen der bekannten Neurofilament-Proteine von gnathostomen Wirbeltieren und des NF₁₈₀-Proteins vom Meereneunauge *Petromyzon marinus* (Jacobs et al., 1995). Letzteres hat zum NF_L von *Lampetra* eine Identität innerhalb der Rod-Domäne von lediglich 44,7% (Tab. 10 Q15). Dies ist überraschend, da die Rod-Domänen beider Proteine zu fast allen übrigen Typ III/IV-Proteinsequenzen höhere Werte aufweisen.

Auffällig sind auch die Vergleichswerte der Rod-Domänen der Typ III-Proteine Vimentin und Desmin des Neunauges: das Vimentin teilt mit den Desminen von Krallenfrosch und Zebrafrosch eine höhere Identität als das Desmin (Tab. 10 I6-J7). Zum Desmin des Katzenhais weisen beide denselben Identitätswert auf (Tab. 10 I8, J8), der mit 70,5% fast 5% über dem direkten Vergleich der beiden Sequenzen liegt (Tab. 10 J9). Die Vergleichswerte des Neunaugen-Vimentins zu Vimentinen der Gnathostomier liegen im gleichen Bereich zwischen 65% und 70%. Neunaugen-Desmin zeigt dagegen zu diesen Vimentinen niedrigere Werte zwischen 60% und 63% (Tab. 10 K9-M10) und liegt damit noch unter den Vergleichswerten der Desmine von Katzenhai, Zebrafrosch und Krallenfrosch (Tab. 10 K6-M8).

Tab. 10 Identitätsmatrix der IF-Proteine der Typen III und IV. Die Identitäten wurden nach dem Modell „p-distance“ berechnet und sind in Prozent Identität angegeben. Die linke untere Hälfte ist ein Vergleich über den gesamten Sequenzbereich der Proteine, die rechte obere Hälfte bezieht sich nur auf den Bereich der konservierten helikalen Rod-Domäne. Die Werte für die Standardabweichungen liegen zwischen 1,5% und 2,9%. Verglichen werden das biochemisch als Typ III klassifizierte B1-Protein von *Branchiostoma lanceolatum* (Bla-B1, Karabinos et al., 1998), das A1-Protein des Tunicaten *Styela plicata*, sowie Vertreter der Typ III-IF-Proteine und Typ IV-IF-Proteine (Plasticin des Zebraärblings *Danio rerio*, Dre-P; Peripherin des Krallenfroschs *Xenopus laevis*, Xla-Pe; saures Gliafilament-Protein des Menschen, Hsa-GFAP; Desmine (D) und Vimentine (V) von *Xenopus*, *Danio*, dem Katzenhai *Scyliorhinus stellaris* (Sst) und Flussneunauge *Lampetra fluviatilis* (Lfl), Gefiltin des Zebraärblings, Dre-Ge; Neurofilament-Proteine (NF_L) von Flussneunauge und Krallenfrosch (NF_M) von Meeresneunauge *Petromyzon marinus* (Pma-NF180) und Mensch). Die Accession-Nummern der Sequenzen finden sich im Anhang unter F2. Die Identitätsfelder der Matrix, die Flussneunaugen-Proteine betreffen sind grau unterlegt. Werte, die zwei Sequenzen von *Lampetra* miteinander vergleichen sind zusätzlich rot hervorgehoben. Aufgrund der fehlenden Head-Domäne des Neunaugen-Desmins sind dessen Werte, die den Gesamtsequenzvergleich betreffen kursiv dargestellt.

Typ III/IV-Identitäten		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
GE-SAMT	ROD	Bla-B1	Spl-A	Dre-Pl	Xla-Pe	Hsa-GFAP	Xla-D	Dre-D	Sst-D	Lfl-D	Lfl-V	Sst-V	Dre-V	Xla-V1/2	Dre-Ge	Lfl-NF_L	Xla-NF_L	Pma-NF180	Hsa-NF_M
	1	Bla-B1	-\	39,1	39,0	39,6	44,0	42,7	42,7	45,6	40,4	42,3	40,7	42,3	42,3	41,2	37,1	40,3	39,2
2	Spl-A1	32,0	-\	42,7	45,6	43,0	49,5	48,9	48,5	46,6	45,4	44,3	44,9	45,6	46,1	38,1	43,0	38,8	39,4
3	Dre-Pl	32,0	37,4	-\	75,1	59,1	62,7	57,5	61,0	59,4	62,6	58,4	62,0	61,7	54,7	45,5	49,2	45,5	45,8
4	Xla-Pe	32,4	39,6	68,3	-\	59,9	64,5	61,9	62,9	58,0	63,1	58,3	61,9	61,9	55,4	45,8	50,2	45,8	47,1
5	Hsa-GFAP	35,9	37,2	51,8	50,6	-\	62,3	60,4	64,3	60,7	63,6	61,4	63,0	62,7	55,6	46,3	47,4	46,2	49,2
6	Xla-D	34,2	42,6	55,0	57,2	55,3	-\	76,3	82,5	68,2	69,5	63,6	67,5	69,5	53,9	48,2	53,0	48,2	47,5
7	Dre-D	35,4	40,5	50,3	54,8	53,5	70,6	-\	74,7	61,4	66,2	61,4	64,6	64,0	56,9	45,6	47,7	46,9	45,9
8	Sst-D	38,4	41,3	53,6	56,8	56,5	76,3	69,6	-\	70,5	70,5	64,3	67,2	68,2	56,2	45,3	51,0	49,2	45,9
9	Lfl-D	36,4	44,8	57,4	56,7	57,9	67,4	61,9	68,9	-\	65,6	60,7	62,7	61,4	51,0	44,6	47,4	45,9	43,9
10	Lfl-V	34,8	38,3	54,5	54,0	54,5	60,4	58,3	61,5	62,8	-\	64,6	69,2	68,2	57,0	46,1	50,8	48,4	46,8
11	Sst-V	31,5	38,0	49,5	50,8	51,2	55,1	52,8	55,0	58,2	52,8	-\	65,6	70,8	54,9	47,9	46,4	48,5	43,9
12	Dre-V	34,3	37,7	55,2	54,7	54,9	58,3	57,7	58,5	60,6	57,6	59,6	-\	76,0	59,9	47,2	50,3	48,9	52,1
13	Xla-V1/2	34,2	38,6	54,6	56,0	55,8	60,8	57,3	60,3	58,6	56,2	61,9	68,0	-\	56,9	46,9	47,4	48,5	46,6
14	Dre-Ge	33,5	36,7	46,8	46,2	46,8	47,8	47,8	47,3	47,2	47,5	47,1	48,9	48,7	-\	50,0	55,5	54,2	58,4
15	Lfl-NF_L	31,3	32,4	41,0	40,4	40,3	41,6	38,7	41,1	43,8	39,8	41,3	41,8	41,4	44,0	-\	51,9	44,7	46,6
16	Xla-NF_L	32,8	32,7	41,7	40,7	39,5	44,5	39,1	42,4	43,2	41,2	39,2	41,0	38,1	45,3	43,9	-\	49,2	49,2
17	Pma-NF180	30,6	29,5	38,0	38,1	38,2	41,0	37,2	39,8	41,1	38,5	39,6	39,4	38,7	42,2	39,8	45,7	-\	63,7
18	Hsa-NF_M	28,3	30,7	37,2	38,1	40,0	40,8	35,9	38,8	40,1	38,8	36,8	40,6	38,1	49,7	41,1	40,4	36,9	-\

Dieser Identitätenvergleich zeigt einerseits den höheren Grad an Distanz, welches das Desmin des Neunauges zu den anderen Typ III-Proteinen hat, andererseits wird die Stellung des Vimentins als Mischform der beiden Subtypen deutlich. Aufgrund der Vielzahl mittlerweile sequenzierter Vimentine und Desmine wird es immer schwieriger, Aminosäurepositionen zu benennen, die absolut charakteristisch für den einen bzw. den anderen Subtyp sind. Dies liegt daran, dass in einzelnen Sequenzen immer wieder isofunktionelle Austausche und Rückmutationen an den sonst konservierten Positionen stattfanden. Häufig sind dennoch über 80% der betreffenden Aminosäurepositionen in allen bekannten Sequenzen konserviert und entweder für Desmin oder Vimentin typisch. Das gilt insbesondere für die Vimentine und Desmine der Knochenfische und Tetrapoden. Dagegen zeigen die

Vimentine der Knorpelfische und des Neunauges, aber auch dessen Desmin eine Kombination von typischen Desmin- und Vimentinpositionen. Daneben zeigen bei diesen Sequenzen viele der sonst charakteristischen Vimentin/Desmin-Positionen Übereinstimmungen mit anderen Typ III-Proteinen (GFAP, Peripherin, Plasticin) oder sogar mit den drei bekannten Tunicaten-IF-Proteinen des Typs A auf (Cin-A2, Spl-A1, Scl-A1). In Abb. 30 ist dies anhand eines Alignments von Vimentinen und Desminen im Bereich der Rod-Domäne dargestellt.

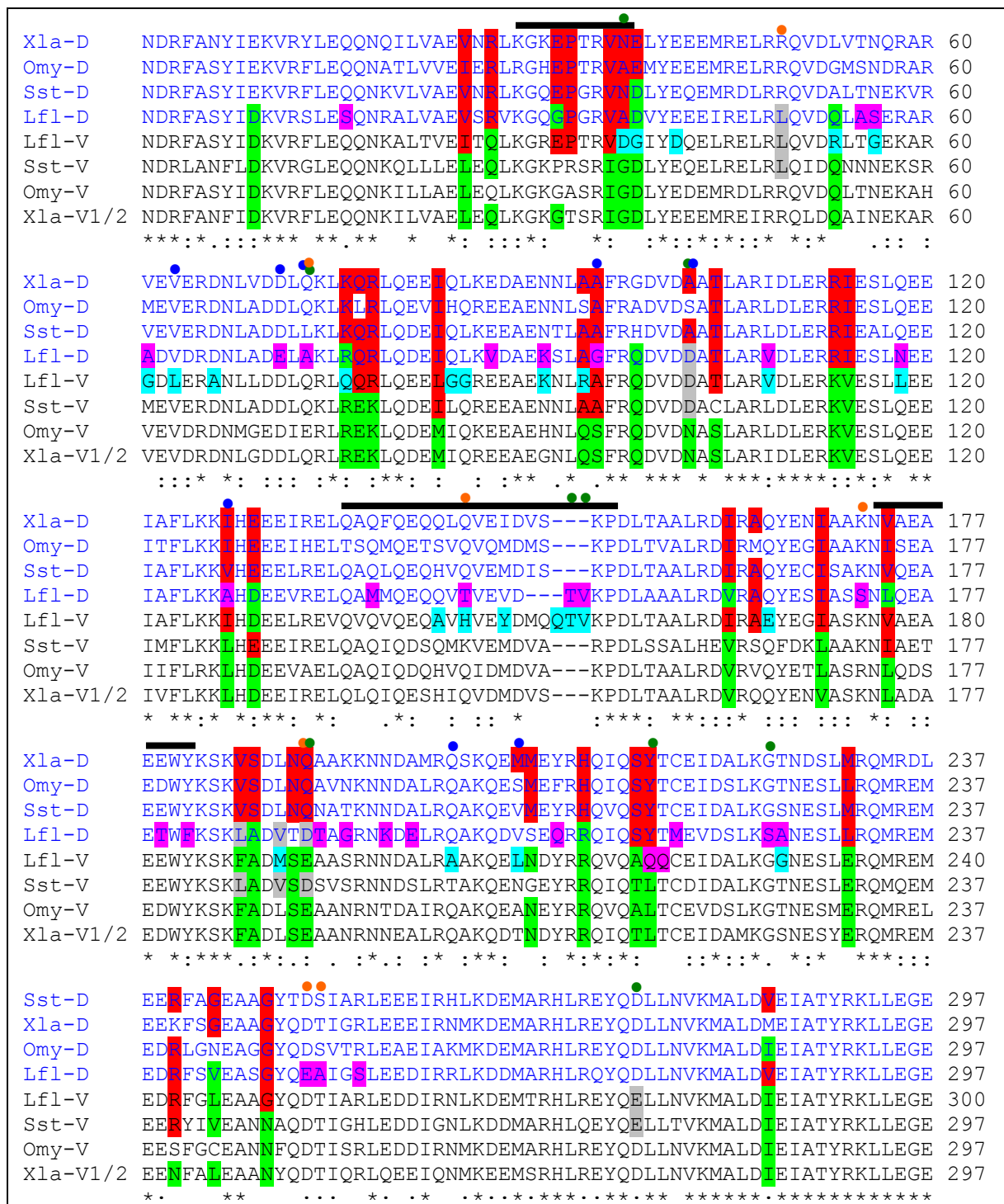


Abb. 30 Legende: siehe nächste Seite.

Abb. 30 Ausschnitt aus einem Sequenzvergleich aller bekannten Typ III-Proteine der Vertebraten. Dargestellt sind die Rod-Domänen der Desmine (D) und Vimentine (V) von Neunauge (Lfl), Katzenhai (Sst), Forelle (Omy) und Krallenfrosch (Xla). Sterne (*), Doppelpunkte (:) und einfache Punkte (.) unter den Sequenzen zeigen verschiedene Konservierungsgrade der dargestellten Aminosäurepositionen an. Die drei Linkerregionen sind durch schwarze Überstriche gekennzeichnet. Typische Aminosäurepositionen der Desmine sind **rot** unterlegt, die der Vimentine **grün**. Aminosäurepositionen, die innerhalb der Desmine und Vimentine ausschließlich in Lfl-D vorkommen, sind **rosa** markiert, entsprechend sind diese Positionen in Lfl-V **hellblau** hervorgehoben. Aminosäurepositionen, die nur Neunauge und Katzenhai teilen, sind **grau** markiert. Häufig korrelieren diese Positionen mit denen anderer Typ III-IF-Proteine (GFAP●, Peripherin/Plasticin●) bzw. mit A-Proteinen der Tunicaten (●).

Im phylogenetischen Baum der bekannten Typ III/IV-Proteine (Abb. 31) wird die relativ geringe Distanz des Neunaugen-Vimentins zu den Desminen deutlich, da es zu ihnen basal angeordnet wird (Abb. 31 a). Die niedrigen Bootstrap-Werte in diesem Bereich zeigen aber auch, dass hier die Auflösungsgrenzen der verwendeten Evolutions-Algorithmen verschwimmen (JTT, Vergleichsbäume nach der Dayhoff PAM-Matrix und „Maximum Parsimony“: Eck und Dayhoff, 1966; Fitch, 1971). Nach der „Maximum Likelihood“-Methode wird Lfl-V sogar in den Ast der GFAPs, Plasticine und Peripherine eingeordnet, in rein mathematischen Modellen („poisson-correction“) dagegen „richtig“ innerhalb des Vimentin-Astes. Daran wird deutlich, wie wichtig neben der Ermittlung seiner Primärstruktur die Analyse der Funktion bzw. der Expressionsmuster des jeweiligen Proteins ist.

Aus dem Gesamtbaum der Typ III/IV-Proteine (Abb. 31 a) geht hervor, dass die Entstehung von Vimentin und Desmin aus einem gemeinsamen Vorläufer in der zeitlichen Nähe vor der Abspaltung der Cyclostomaten von der Wirbeltierlinie erfolgt sein muss. Nicht ersichtlich wird allerdings, ob vor der getrennten Evolution beider Protein-Typen das ancestrale Gen funktional eher für ein Desmin oder für ein Vimentin codierte oder das Vorläuferprotein vielleicht sogar beide Aufgaben erfüllte. Die vergleichbaren Mengen von Lfl-V in Muskel-Geweben des Neunauges und die vielen desmintypischen Aminosäurepositionen auch bei den Vimentinen der Knorpelfische könnten jedoch als Hinweise für die Ursprünglichkeit des stärker konservierten Desmin-Typs gewertet werden, von dem sich die Vimentine einst ableiteten und mit fortschreitender Evolutionsdauer immer weiter entfernen.

Beide Proteine wie auch das Neurofilament-Protein (Lfl-NF_L) bilden jeweils eine optimale Außengruppe für die Erstellung phylogenetischer Bäume von IF-Protein-Subtypen. Wie schon bei K8 und K18 zeichnen auch diese mit hohen Bootstrap-Werten an den meisten Aufspaltungsereignissen das klassische Konzept der Wirbeltier-Evolution nach (Abb. 31 b, c und d). Noch ungesicherte Verzweigungen (bspw. innerhalb der Mammalia oder die Abgrenzung des Flösselhechts (Pse) und Störs (Aba) von den Teleosteen) treten in den Subtypen-Bäumen an gleichen Positionen auf und geben so Hinweise auf mögliche weitere Forschungsobjekte, um den molekularen Stammbaum der Vertebraten auf Basis der Typ III/IV-Proteine weiter zu verbessern.

TYP III UND TYP IV-IF-PROTEINE DER CHORDATEN / VIMENTIN, DESMIN UND NF_L

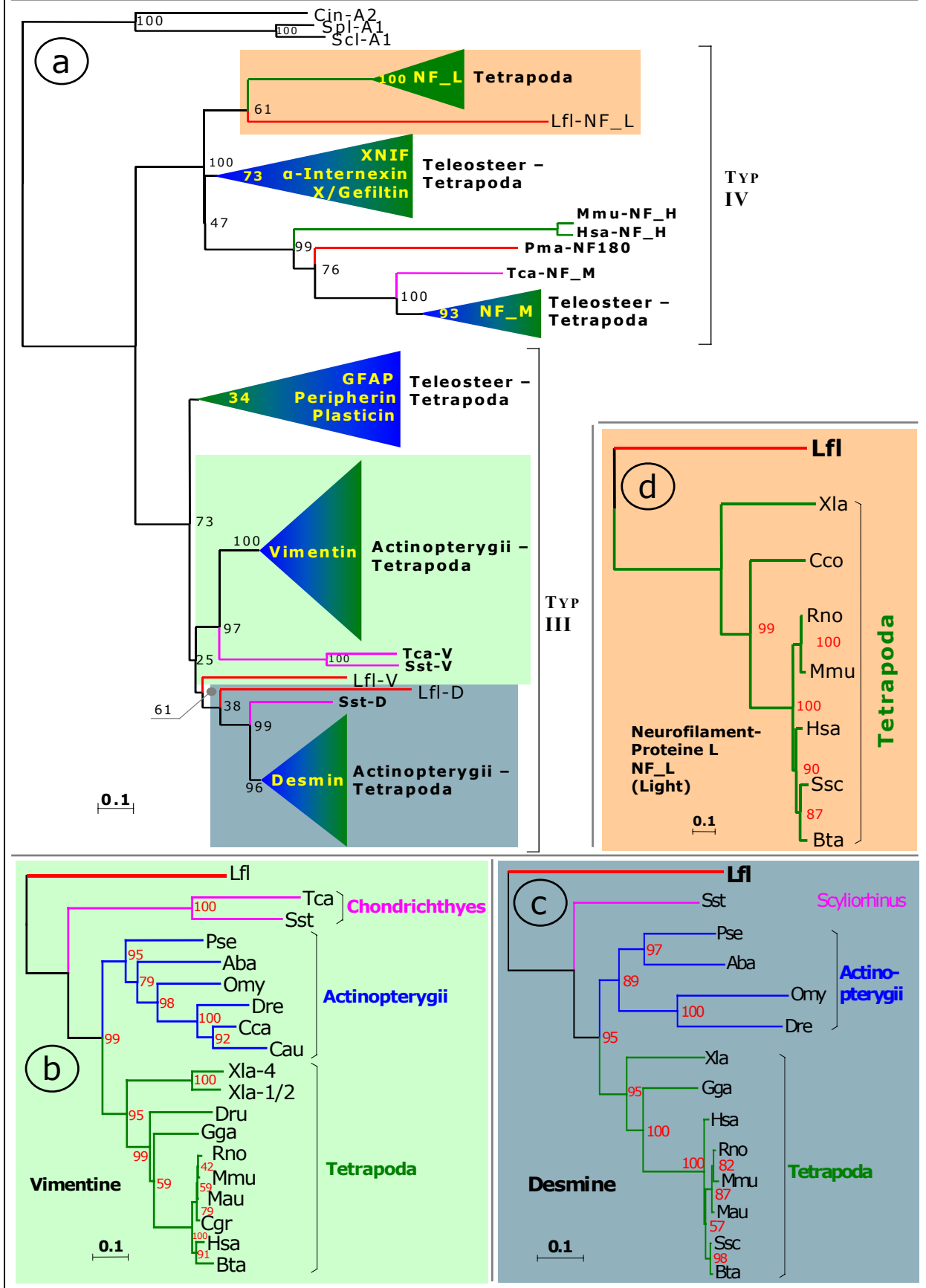


Abb 31 Legende: siehe nächste Seite.

Abb. 31 Evolution der IF-Proteine der Typen III und IV. **a** Phylogenetischer Baum der Typ III/IV IF-Proteine nach einem multiplen Sequenzvergleich der Head- und Rod-Domänen von 73 Proteinen. Die A-IF-Proteine der Ascidien *Styela plicata* (Spl-A1), *Styela clava* (Scl-A1) und *Ciona intestinalis* (Cin-A2) bilden die Außengruppe. **b–d** Phylogenetische Subtypen-Bäume von Vimentinen (b), Desminen (c) und Neurofilament L-Proteinen (d) mit jeweils allen bekannten orthologen Proteinen und den Sequenzen des Flussneunauges als Außengruppe. Die Distanzmarkierungen unten links in **a–d** beschreiben 0,1 Aminosäuresubstitutionen pro Position (korrigiert nach JTT). Die Typ III/IV-IF-Proteine der Agnathen (Lfl + Pma) sind mit **roten** Ästen dargestellt, die der Knorpelfische (Chondrichthyes) **rosa**. Proteine der Strahlenflosser (Actinopterygii) sind mit **blauen** Ästen gezeichnet bzw. mit **blauer** Taxa-Bezeichnung versehen, die der landlebenden Wirbeltiere (Tetrapoda) entsprechend **grün**. Monophyletische Gruppen sind aus Platzgründen zu farbigen Dreiecken zusammengefasst. Dem Desmin des Flussneunauges (Lfl-D) fehlen bisher die für die Head-Domäne codierende Sequenz. Ebenso fehlen dem Neurofilament-Protein M des Rochens *Torpedo californica* (Tca-NF_M), dem Vimentin des Hamsters *Cricetulus griseus* (Cgr-V) und dem Desmin des Huhns *Gallus gallus* (Gga-V) kürzere Bereiche der für die Head-Domäne codierenden Sequenz. Weitere Erklärungen zu den Protein-Kurzbezeichnungen u. die Accession-Nummern finden sich im Anhang unter F2.

3. *K α und K γ – keratinartige IF-Proteine der Agnathen*

Die α - und γ -Proteine des Pazifischen Schleimaals *Eptatretus stouti* (Est-K α , Est-K γ) bilden in Kombination mit einer geringen Anzahl von Mikrotubuli fadenförmige Filamente, die als Mitbestandteile des extracorporal abgesonderten Schleims dessen Eigenschaften stark beeinflussen. Diese extrazelluläre Funktion von Intermediärfilamenten galt bisher als einmalig im Tierreich und geht einher mit einer von allen bekannten IF-Typen weit distanzierten Primärstruktur der beiden Proteine, die jedoch prinzipiell alle charakteristischen Merkmale der Chordaten-IF-Proteine zeigen. Vor allem die obligate heterodimere Filamentbildung, aber auch das Vorhandensein von ausgeprägten Glycin-Ketten („loops“) in den Kopf- und Schwanzregionen der Proteine lassen auf eine Verbindung zu den Typ I- (γ) bzw. Typ II-Keratinen (α) schließen (Koch et al., 1994; 1995). Die diesen eigentümlichen IF-Proteinen bisher ähnlichsten Proteinsequenzen fand ich nun beim Flussneunauge. Mindestens fünf Proteine von *Lampetra* zeigen die bislang niedrigsten Distanzwerte zu den keratinartigen IF-Proteinen des Schleimaals (Tab. 11). Davon sind drei γ -artig (K γ 1, K γ 2, K γ 3) und zwei α -artig. (K α 1, K α 2). Daneben wurde noch ein Genfragment sequenziert (*g-lfl-ka3*), dessen zwei Exons für die 219 C-terminalen Aminosäuren eines möglichen dritten α -IF-Proteins codieren.

Lfl-K α 1, Lfl-K γ 1 und Lfl-K γ 2 wurden in der Epidermis nachgewiesen. Die in der 2D-PAGE beobachteten ungefähr äquimolaren Mengen und vergleichbaren Massen der drei Proteine sind ein Hinweis für die mögliche heterodimere Filamentbildung. In CKBB-Tests mit humanen, biotinylierten K8 bzw. K18 reagierten sie zwar wiederholt nicht (Brauer, 1993; siehe Ergebnisse, C 2.4, Abb.17 a, b), doch das könnte auch durch ihre stark abgeleitete Primärstruktur bedingt sein, die möglicherweise ausschließlich Heterodimerisierung mit einem α - bzw. γ -Vertreter erlaubt. Um dies herauszufinden, wäre es notwendig, rekombinantes K α und K γ des Neunauges herzustellen und diese in einem modifizierten CKBB-Test einzusetzen, oder eine Filamentbildung direkt elektronenmikroskopisch zu beobachten.

Zur Einordnung dieser speziellen IF-Proteine innerhalb der etablierten Typen der Chordaten listet Tab. 11 diejenigen Proteinsequenzen der Rod-Domänen auf, deren Distanzwerte zu den K α - bzw. K γ von Neunauge und Schleimaal am niedrigsten sind. Zum Vergleich sind drei der biochemisch als Typ I und Typ II klassifizierten IF-Proteine von *Branchiostoma* (E1 und E2) und *Styela* (C1; Karabinos et al., 1999; Wang et al., 2000) mitaufgeführt. Mit Ausnahme des IF-Proteins E2 von *Branchiostoma* zeigen dabei alle verglichenen Rod-Domänen relativ niedrige Distanzwerte zu Vimentin und Desmin. Während im übrigen die K α -Proteine den Typ II-Keratinen am nächsten stehen, sind bei K γ -Proteinen sowohl Vertreter der Cephalochordaten, der Tunicaten, der Typ I-Keratine als auch der Typ II-Keratine unter den 20 niedrigsten Distanzwerten zu finden. Die Distanzen vor allem von Lfl-K γ 1 und Lfl-K γ 2 zu Est-K γ sind etwas höher als dessen Distanz zu Lfl-K γ 3 und deutlich größer als die Rod-Domänen der K α -Proteine untereinander.

Tab. 11 Distanzen von $K\alpha$ und $K\gamma$ zu anderen IF-Proteinen. Aufgeführt sind die jeweils 20 niedrigsten Distanzwerte und die dazugehörigen IF-Proteine aus der nach JTT berechneten Matrix des Gesamtbaums (Rod-Domänen-Vergleich, vgl. Abb. 25) zu den Typ II-keratinartigen IF-Proteinen Lfl- $K\alpha$ 1, Lfl- $K\alpha$ 2, Est- $K\alpha$, Bla-E2 und Scl-C1 (obere Hälfte) bzw. zu den Typ I-keratinartigen IF-Proteinen Lfl- $K\gamma$ 1, Lfl- $K\gamma$ 2, Lfl- $K\gamma$ 3, Est- $K\gamma$ und Bla-E1 (untere Hälfte). Weitere Erklärungen zu den Protein-Kurzbezeichnungen u. die Accession-Nr. finden sich im Anhang unter F2. Distanzwerte: Anzahl der Aminosäuresubstitutionen pro Position (korrigiert nach JTT). Die unterschiedlichen IF-Typen und Distanz-Grade sind durch verschiedene Farben bzw. Schattierungen des Hintergrundes gekennzeichnet.

α	Lfl- $K\alpha$ 1	Lfl- $K\alpha$ 2	Est- $K\alpha$	Bla-E2	Scl-C1					
1	Lfl- $K\alpha$ 2	0,984	Lfl- $K\alpha$ 1	0,984	Lfl- $K\alpha$ 1	1,047	Bfl-D1	1,090	Moc-C1	0,381
2	Est- $K\alpha$	1,047	Est- $K\alpha$	1,098	Lfl- $K\alpha$ 2	1,098	Bla-D1	1,117	Cin-C2	0,480
3	Lfl-K1	1,834	Xla-K55	1,993	Hsa-K2	2,163	Rca-K_ie	1,801	Gga-D	1,476
4	Rca-K_ie	1,841	Rca-K_ie	2,030	Sst-K8	2,228	Omy-K1	1,804	Omy-D	1,489
5	Xla-K55	1,842	Cau-Ge	2,046	Dru-V	2,243	Omy-K3	1,812	Pse-D	1,505
6	Hsa-V	1,880	Gga-K_oto	2,059	Rno-V	2,244	Omy-K2	1,830	Dre-D	1,524
7	Rca-K8	1,894	Rca-K_rlk	2,066	Mau-V	2,244	Bfl-B1	1,842	Sst-D	1,535
8	Bta-V	1,899	Lfl-K3	2,071	Mmu-V	2,244	Dre-Kaf13	1,851	Mmu-D	1,539
9	Rno-V	1,904	Xla-K_xlk	2,103	Mmu-D	2,245	Lfl-K1	1,851	Hsa-D	1,541
10	Mau-V	1,904	Rca-K8	2,126	Hsa-V	2,250	Xla-K55	1,858	Mau-D	1,541
11	Mmu-V	1,904	Lfl-K1	2,129	Mau-D	2,256	Rca-K8	1,863	Xla-D	1,550
12	Cgr-V	1,905	Hsa-V	2,135	Bta-D	2,258	Dre-K"8"	1,867	Aba-D	1,556
13	Pse-V	1,913	Bta-V	2,137	Ssc-D	2,258	Bla-B1	1,882	Rno-D	1,558
14	Dru-V	1,915	Rno-V	2,138	Bta-V	2,262	Xla-K8	1,886	Bta-D	1,560
15	Xla-K8	1,919	Mau-V	2,138	Cgr-V	2,262	Dre-Kaf19	1,889	Ssc-D	1,560
16	Rca-K_rlk	1,931	Mmu-V	2,138	Rno-D	2,265	Pse-K8	1,892	Cau-GFAP	1,580
17	Dre-Kaf13	1,933	Dru-V	2,140	Gga-K_oto	2,277	Lfl-K3	1,895	Pse-V	1,591
18	Gga-K_oto	1,933	Cgr-V	2,143	Gga-V	2,277	Hsa-D	1,903	Rno-GFAP	1,596
19	Xla-K_xlk	1,943	Gga-V	2,147	Hsa-D	2,279	Gga-K_oto	1,910	Mmu-GFAP	1,601
20	Lfl-K2	1,951	Omy-K3	2,150	Cau-Ge	2,285	Bta-D	1,910	Dru-V	1,609
γ	Lfl- $K\gamma$ 1	Lfl- $K\gamma$ 2	Lfl- $K\gamma$ 3	Est- $K\gamma$	Bla-E1					
1	Lfl- $K\gamma$ 2	0,701	Lfl- $K\gamma$ 1	0,701	Lfl- $K\gamma$ 1	1,462	Lfl- $K\gamma$ 3	1,534	Bla-Y1	1,125
2	Lfl- $K\gamma$ 3	1,462	Lfl- $K\gamma$ 3	1,529	Lfl- $K\gamma$ 2	1,529	Lfl- $K\gamma$ 2	1,710	Bla-k1	1,167
3	Est- $K\gamma$	1,732	Est- $K\gamma$	1,710	Est- $K\gamma$	1,534	Lfl- $K\gamma$ 1	1,732	Bfl-IF1	1,266
4	Bfl-B1	1,854	Bfl-B1	1,843	Mmu-D	1,863	Cca-V	2,073	Lfl-K18	1,838
5	Cin-A2	1,892	Bla-B1	1,895	Mau-D	1,865	Cau-GFAP	2,107	Mmu-GFAP	1,898
6	Bla-B1	1,939	Cin-D2	1,926	Rno-D	1,872	Xla-D	2,111	Mmu-D	1,904
7	Bta-D	1,981	Mmu-D	1,986	Bta-D	1,893	Pse-D	2,113	Mau-D	1,908
8	Ssc-D	1,981	Hsa-D	1,990	Ssc-D	1,893	Lfl-D	2,125	Rno-D	1,908
9	Hsa-D	1,996	Bta-D	1,992	Hsa-D	1,905	Mmu-D	2,129	Lfl-K10	1,910
10	Gga-D	1,998	Ssc-D	1,992	Bfl-B1	1,935	Mau-D	2,130	Cau-GFAP	1,913
11	Mau-D	2,012	Gga-D	1,993	Cau-GFAP	1,941	Rno-GFAP	2,132	Bta-D	1,914
12	Mmu-D	2,032	Lfl-K2	1,999	Omy-D	1,956	Aba-D	2,137	Ssc-D	1,914
13	Rno-D	2,033	Cin-A2	2,007	Pse-K8	1,960	Hsa-GFAP	2,137	Sst-D	1,919
14	Lfl-D	2,039	Mau-D	2,010	Pse-V	1,963	Rno-D	2,139	Bta-GFAP	1,927
15	Aba-D	2,041	Lfl-V	2,013	Omy-K8	1,964	Aba-K_1Ha1	2,140	Hsa-D	1,928
16	Gga-K19	2,058	Rno-D	2,030	Pse-D	1,967	Hsa-D	2,141	Rno-GFAP	1,929
17	Sst-D	2,059	Bta-K_vib	2,031	Dre-D	1,968	Mmu-GFAP	2,142	Gga-D	1,939
18	Cin-D2	2,063	Lfl-K18	2,042	Gga-D	1,974	Dre-V	2,144	Bfl-B1	1,944
19	Hsa-K17	2,067	Lfl-K3	2,058	Bla-B1	1,976	Bfl-B1	2,146	Mmu-K15	1,945
20	Xla-D	2,094	Lfl-K10	2,059	Omy-K8.1	1,976	Bta-D	2,147	Pse-V	1,954
$K\alpha$ bzw. $K\gamma$	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV	Tunicaten	Cephalochordaten	Lfl-K/V/D			
> 0,500	0,500-0,999	1,000-1,499	1,500-1,999	> 2,000						

Die Beziehung der $K\alpha$ - und $K\gamma$ -Proteine des Neunauges zu den Typ I- und Typ II- Keratinen, die sich in der Stellung im Gesamtbaum (siehe Abb. 25) und auch in den ausgeprägten Glycin-„loops“ der Head- und Tail-Domänen äußert, ist offensichtlich. Die epidermale Expression ist ebenso typisch für Keratine. Daneben ist aber gleichzeitig eine Nähe zu den Typ III und Typ IV-Proteinen feststellbar: so besitzen $K\gamma 1$ und $K\gamma 2$ auch das bei Typ III-Proteinen (und K8-orthologen Typ II-Keratinen) vorhandene konservierte Motiv in der Tail-Domäne (vgl. Abb. 28). $K\alpha 2$ und $K\gamma 2$ konnten in Antikörper-Screenings von dem monoklonalen Anti-Desmin-Antikörper DE-B-5 detektiert werden, $K\alpha 1$ wurde in Immunblots von den anti (*Xenopus*)-Antiseren „anti-Desmin 1“ und „anti-Desmin 2“ markiert. DNA-Sonden, die für Forellen-Vimentin codieren, isolierten $K\gamma 2$ und $K\gamma 3$ aus der cDNA-Bank. Mit degenerierten, desminspezifischen Primern durchgeführte PCR amplifizierten Teilsequenzen der für die Coil 2B von $K\alpha 1$ und $K\alpha 2$ codierenden genomischen DNA bzw. cDNA. Diese Sequenz von $K\alpha 2$ als DNA-Sonde detektierte schließlich die für das Neurofilament-Protein LFL-NF_L codierende cDNA.

Von den bekannten IF-Genen der Vertebraten unterscheiden sich die $K\alpha$ -Gene des Neunauges durch ein zusätzliches Intron im 5'-Ende der für die Rod-Domäne codierenden DNA (*g-lfl-ka1-3*). Dafür fehlen ihnen Introns in der für die Tail-Domäne codierenden DNA (*g-lfl-ka3*; Abb. 32).

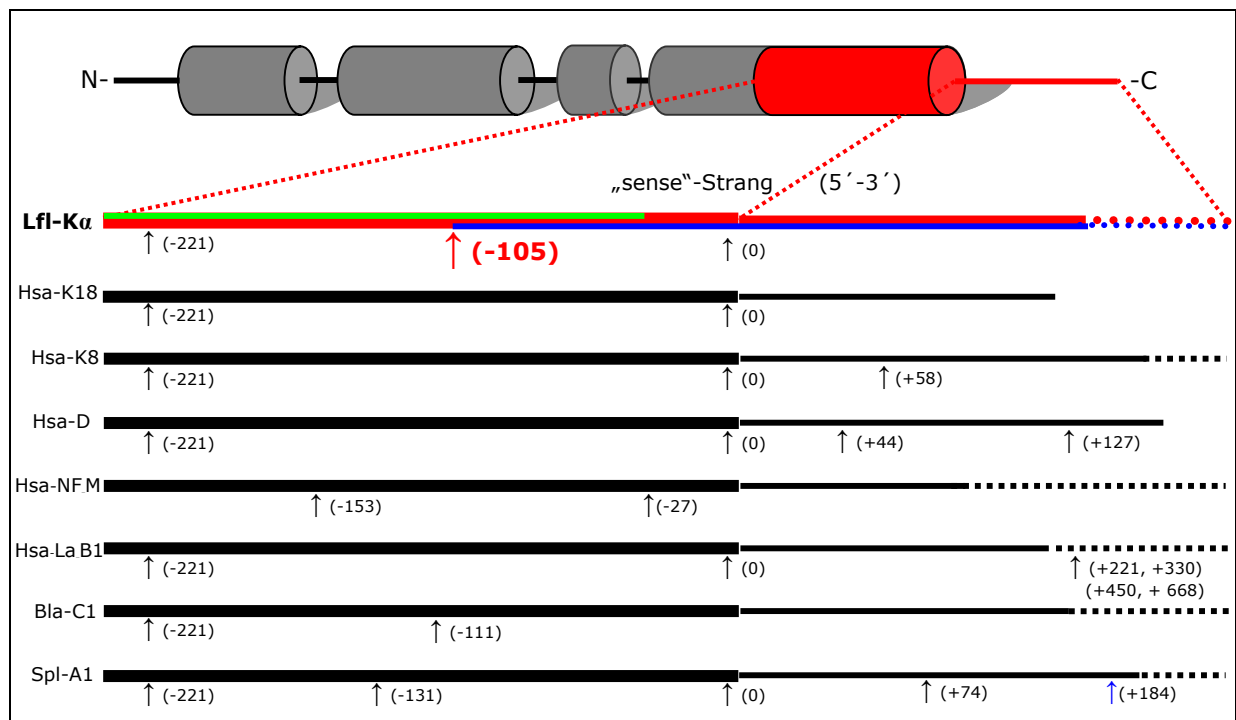


Abb. 32 Bekannte Intron-Positionen (↑) der $K\alpha$ -Proteine des Neunauges innerhalb der für den C-terminalen Bereich der Coil 2B und der Tail-Domäne codierenden genomischen DNA. Im Protein-Domänen-Modell ist der entsprechende Bereich der bekannten Intron-Positionen **rot** markiert. Die Exons von *g-lfl-ka1* und *g-lfl-ka2* sind mit einem **grünen** Strich symbolisiert, entsprechend *g-lfl-ka3* mit einem **blauen** Strich. Darunter sind die Intron-Positionen des gleichen Bereichs der für Keratin 18 (K18), Keratin 8 (K8), Desmin (D), M-Neurofilament-Protein (NF_M), Lamin B1 (La-B1) des Menschen (Hsa) sowie für C1 von *Branchiostoma* (Bla) und A1 von *Styela plicata* (Spl) codierenden genomischen DNA schematisch dargestellt. Die Zahlen in Klammern geben an, wieviele Nukleotide das Intron „downstream“ (+) oder „upstream“ (-) von der konservierten Intron-Position am C-terminalen Ende der Coil 2B (0) liegen. Die für die teilweise sehr langen Tail-Domänen codierenden Gensequenzen sind verkürzt dargestellt (gestrichelte Linien).

Die Anzahl der Nukleotide im Bereich des 3'-Ende der für die Coil 2B codierende DNA ist typübergreifend konserviert, so dass Intron-Positionen direkt miteinander verglichen werden können. Die in Abb. 32 dargestellten Abschnitte der menschlichen IF-Gene stehen stellvertretend für alle derzeit bekannten IF-Genstrukturen der Vertebraten: Keine genomische Sequenz weist eine Intron-Position auf, die genau zwischen den gleichen Nukleotiden wie das zusätzliche Intron der genomischen Klone *g-lfl-ka1-3* liegt. Die in diesem Bereich vorhandenen Intron-Positionen der Gensequenzen von Bla-C1 (*Branchiostoma lanceolatum*) und Spl-A1 (*Styela plicata*) liegen sechs bzw. 26 Nukleotide weiter in 5'-Richtung des „sense“-Strangs. Spl-A1 unterscheidet sich daneben durch weitere Intron-Positionen in der für die Tail-Domäne codierenden DNA von *g-lfl-ka3*, Bla-C1 fehlt die ansonsten in fast allen IF-Genen konservierte Intron-Position am 3'-Ende der für die Coil 2B codierenden DNA (Karabinos et al., 1999; Wang et al., 2000). Einen Überblick über die Genstrukturen der bekannten IF-Gene geben u. a. Julien et al. (1987); Dodemont et al. (1990); Krauss und Franke (1990); Riemer und Weber (1994); Maeno et al. (1995); Riemer und Weber (1998); Erber et al. (1999); Karabinos et al. (1999); Langbein et al. (1999); Wang et al. (2000).

Die $K\alpha/K\gamma$ -Proteine als stark abgeleitete keratinartige IF-Proteine sind funktionell vielleicht am ehesten mit den Haar-Keratinen der Säugetiere vergleichbar, denn ihr Auftreten ist nach heutigem Wissensstand ebenfalls auf nur eine einzelne Gruppe innerhalb der Wirbeltiere, die Agnathen beschränkt (siehe unten) und vermutlich eng mit den Besonderheiten des Integuments verknüpft. Die Aufspaltung der Typ II-Keratine und der $K\alpha$ -Proteine bzw. der Typ I-Keratine und der $K\gamma$ -Proteine erfolgte vermutlich zu einer Zeit, als die IF-Protein-Typen der Chordaten untereinander noch relativ ähnlich waren. Die $K\alpha$ - und vor allem die $K\gamma$ -Proteine veränderten sich danach wahrscheinlich sehr viel stärker als die Typ I/II-Keratine oder die Typ III-Proteine, was heute zu den hohen Distanzwerten selbst im Bereich der Rod-Domäne führt. Die weniger konservierten Head- und Tail-Domänen eignen sich angesichts dieser Umgestaltungen nicht für Alignments der $K\alpha/K\gamma$ -Proteine mit anderen IF-Proteinen (Abb. 25, Abb. 33). Der Vergleich der Head- und Tail-Domänen der $K\alpha$ - bzw. $K\gamma$ -Proteine untereinander zeigt dagegen noch konservierte Bereiche (vgl. Ergebnisse, Abb. 15, Abb. 16). Aus diesem Grund bildet jeweils ein zusammengesetztes Alignment der kompletten Sequenzen der $K\alpha$ - bzw. $K\gamma$ -Proteine und der Rod-Domänen der übrigen verwendeten Sequenzen (anhand der Tab. 11) die Grundlage für die Bäume in Abb. 33.

Durch den Bezug zu anderen IF-Proteinen wird die gemeinsame Gruppierung von Lfl- $K\alpha 2$ mit Est- $K\alpha$ und Lfl- $K\gamma 3$ mit Est- $K\gamma$ offensichtlich (vgl. Abb. 25). Interessanterweise sind es gerade diese beiden Neunaugen-Proteine, die bisher in keinem Gewebe durch 2D-PAGE bzw. MALDI-MS nachgewiesen werden konnten. Der Bootstrap-Wert des Astes von Lfl- $K\alpha 2$ und Est- $K\alpha$ ist zwar niedrig, doch zeigt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen durch die theoretischen Werte für die isoelektrischen Punkte, die mit pH 8,64 (Est- $K\alpha$) und pH 8,80 (Lfl- $K\alpha 2$) jeweils deutlich basisch sind, während der von Lfl- $K\alpha 1$ bei pH 5,77 liegt. Der Anteil an der Aminosäure Threonin in der Rod-

Domäne – bei Est-K α mit 13,21% auffällig hoch (Koch et al., 1994) – ist auch bei Lfl-K α 2 mit 9,18% fast doppelt so groß wie der von Lfl-K α 1 (4,73%).

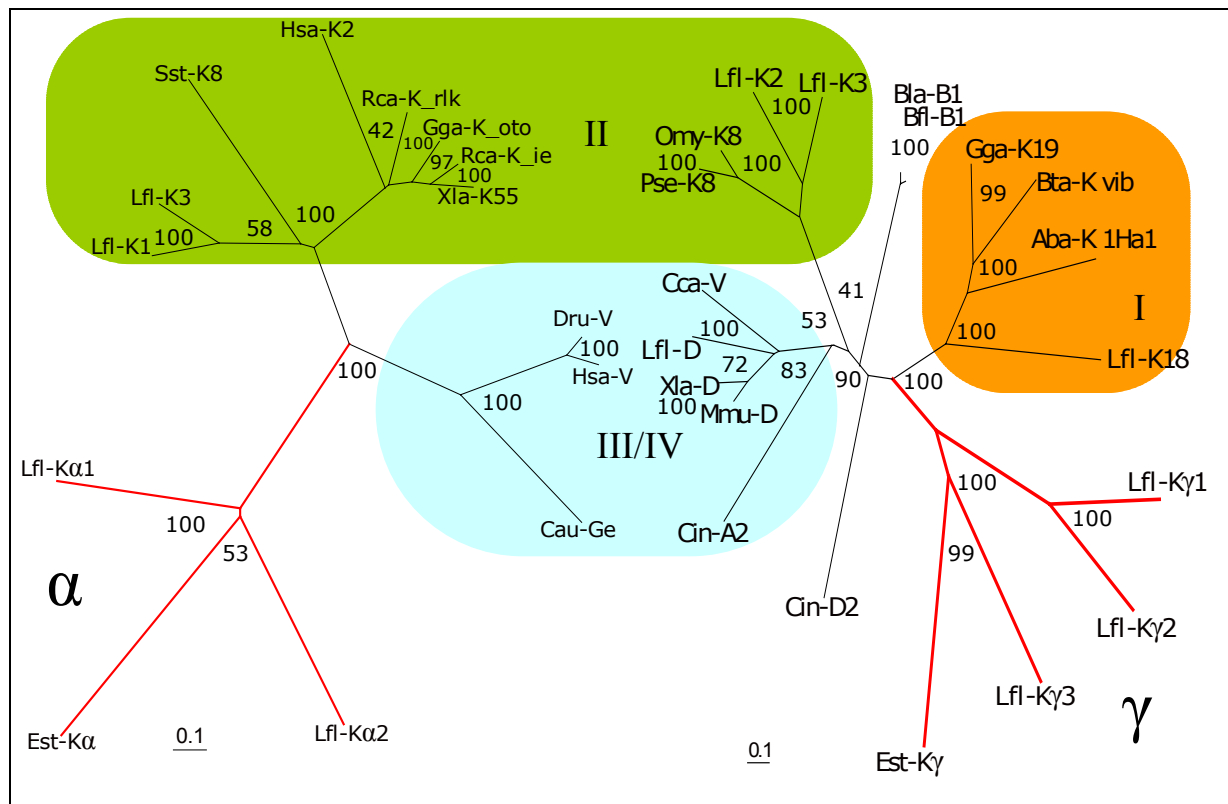




Abb. 33 Radiale Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse der K α - (links) bzw. K γ -Proteine (rechts) von *Lampetra fluviatilis* und *Eptatretus stouti* sowie den jeweils nächstehenden IF-Proteinsequenzen aus Tab. 11 nach einem Alignment der kompletten Sequenzen der α - bzw. γ -IF-Proteine (rote Äste) und den Rod-Domänen der verwendeten Typ I-Keratine (orange unterlegt), Typ II-Keratine (grün unterlegt) Typ III/IV-IF-Proteine (hellblau unterlegt) und IF-Proteine von Tunicaten (*Ciona*, *Cin*) und Cephalochordaten (*Branchiostoma*, *Bla* und *Bfl*). Die Distanzmarkierungen unten beschreiben 0,1 Aminosäuresubstitutionen pro Position (korrigiert nach JTT). Weitere Erklärungen zu den Protein-Kurzbezeichnungen u. die Accession-Nummern finden sich im Anhang unter F2.

Lfl-K γ 3 hat von den drei γ -Varianten des Neunauges zu Est-K γ den niedrigsten Distanzwert (siehe Tab. 11). Dieser Sequenz fehlt ebenso wie Est-K γ das typübergreifende Consensus-Motiv in der Taildomäne und wiederum ist der Threonin-Gehalt in der Rod-Domäne auffällig: bei Lfl-K γ 1 und Lfl-K γ 2 liegt er bei jeweils bei 4,5%, bei Lfl-K γ 3 und Est-K γ beträgt er dagegen 10,26% bzw. 10,22%. Die hohen Threonin-Anteile der K α /K γ -Proteine des Schleimaals sind möglicherweise für die parallele Anlagerung tausender Protein-Dimere zur Bildung der fadenförmigen Filamente verantwortlich (Koch et al., 1995).

Von der dritten α -Variante des Neunauges (*g-lfl-ka3*) konnte nur die für die Tail-Domäne sowie den C-terminalen Teil der Coil 2B codierenden Exons sequenziert werden. Ob das entsprechende Protein tatsächlich exprimiert wird ist noch ungeklärt. Vergleicht man dennoch die abgeleitete Aminosäuresequenz („Lfl-K α 3“) des Genfragments mit den entsprechenden Bereichen der drei anderen K α -Sequenzen von Neunauge und Schleimaal, zeigt sich eine deutlich höhere Identität und ein niedrigerer Distanzwert zu K α 1 als zu K α 2. Entsprechendes gilt für den Vergleich der kurzen aber

hochkonservierten Sequenz der für das C-terminale Ende der Coil2B und die ersten elf Aminosäuren des Tails codierenden DNA (Tab. 12).

Tab. 12 Vergleich der bekannten $K\alpha$ -Sequenzen. Rechte obere Hälfte: Distanzwerte und Identitäten von 140 konservierten Nukleotiden der für das C-terminale Ende der Coil2B und die ersten elf Aminosäuren des Tails codierenden DNA-Sequenzen. Linke untere Hälfte: Distanzwerte und Identitäten der abgeleiteten Aminosäuresequenzen im C-terminalen Bereich der Coil 2B sowie der gesamten Tail-Domänen. Distanzen (DNA) nach Kimura, Nukleotidaustausche pro Position unter Berücksichtigung von Transitionen und Transversionen (Kimura, 1980); Distanzen (Aminosäuren): Aminosäuresubstitutionen pro Position (korrigiert nach JTT); Identitäten (in Prozent): p-distance, ohne Berücksichtigung von Rückmutationen, max. Standardabweichung 3,8%. In der Tabellen-Überschrift sind die verglichenen Bereiche im Protein-Domänenmodell rot dargestellt.

Distanzen und Identitäten der $K\alpha$ -Sequenzen				
Aminosäuren (« Coil 2B » u. Tail)  DNA (140 bp) 				
DNA \ Protein	Lfl-Kα1	"Lfl-Kα3"	Lfl-Kα2	Est-Kα
Lfl-Kα1	- \-	0,10 90,7%	0,21 82,9%	0,32 75,0%
"Lfl-Kα3"	0,94 63,9%	- \-	0,19 83,6%	0,34 72,9%
Lfl-Kα2	1,30 55,9%	1,43 51,7%	- \-	0,33 73,6%
Est-Kα	1,59 50,3%	1,82 44,3%	1,37 50,0%	- \-

Anhand der beschriebenen Ähnlichkeiten (Tab. 11 und 12) der Verzweigungen in den Bäumen (Abb. 33) sowie der Expressionsmuster der epidermalen $K\alpha/K\gamma$ -Proteine des Neunauges (Ergebnisse, C5, Abb. 23 a, c) läßt sich die Hypothese aufstellen, dass $K\alpha 1$ und „ $K\alpha 3$ “ heterodimere Partner von $K\gamma 1$ und $K\gamma 2$ sein könnten. Eine Komigration von „ $K\alpha 3$ “ mit $K\alpha 1$ in der 2D-PAGE der Epidermis-Cytoskelettpräparation analog der Komigration von $K\gamma 1/2$ kann nicht ausgeschlossen werden: viele Massenwerte des Proteinflecks E1 (Ergebnisse, C5, Abb. 23 a) konnten $K\alpha 1$ trotz seiner eindeutigen Identifizierung nicht zugeordnet werden. Ähnlich war es vor der Sequenzierung von $K\gamma 2$ bezüglich des Proteinflecks E3 (Komigration von $K\gamma 1$ und $K\gamma 2$). $K\alpha 2$ und $K\gamma 3$ sind die den Schleimaal-IF-Proteinen Est-K α und Est-K γ ähnlichsten Proteine und bilden möglicherweise das dritte heterodimere $K\alpha/K\gamma$ -Expressionspar von *Lampetra fluviatilis*.

Aus den Beziehungen der $K\alpha/K\gamma$ -Proteine untereinander ergeben sich neue Konsequenzen für die Bewertung des Verhältnisses von Myxinoidea (Schleimaale) und Petromyzontoidae (Neunaugen). Die Monophylie der beiden Gruppen (Cyclostomaten-Hypothese, zuerst aufgestellt von Dumeril (1806)) ist nämlich keineswegs unumstritten (Abb. 34). Vor allem auf morphologischen Analysen basierend wurden die Schleimaale als besonders ursprünglich charakterisiert und der resultierenden monophyletischen Gruppe der Vertebraten (Neunaugen und Kiefermänder, Vertebraten-Hypothese) gegenübergestellt (Lovtrup, 1977; Hardisty, 1982; Janvier, 1996; Vogel und Gemballa, 2000).

Phylogenetische Untersuchungen anhand von Nukleotid- und Proteinsequenzvergleichen unterstützten dagegen eher die Cyclostomaten-Hypothese (Stock und Whitt, 1992; Mallatt und Sullivan, 1998; Kuraku et al., 1999). Die Untersuchungen an mitochondrialer DNA kamen je nach verwendeten Algorithmen zu unterschiedlichen Ergebnissen (Rasmussen et al., 1998; Delarbre et al., 2000).

Die $K\alpha/K\gamma$ -Proteine sind bis jetzt nur von Schleimaalen und Neunaugen bekannt. Dadurch lassen sie sich zwar nicht mit orthologen Proteinen anderer Chordatengruppen wie bspw. den Chondrichthyes oder Cephalochordaten vergleichen, sind jedoch gerade deswegen ein gutes Argument für die Cyclostomaten-Hypothese: Sie können als autapomorphes Merkmal der Schleimaale und Neunaugen gewertet werden und sprechen damit für die Monophylie dieser Gruppe, mit den Gnathostomaten als Schwestergruppe (Abb. 34 a). Die Ähnlichkeiten von Lfl- $K\gamma$ 3 mit Est- $K\gamma$ bzw. Lfl- $K\alpha$ 2 mit Est- $K\alpha$ sind sogar ein Hinweis für eine längere gemeinsame Entwicklung der Cyclostomaten. Alternativ könnte es auch so gewesen sein, dass die Gnathostomier in ihrer frühen Entwicklung ebenfalls $K\alpha/K\gamma$ -Proteine besaßen, diese jedoch im Verlauf der epidermalen Umgestaltungen sekundär wieder verloren haben (Abb. 34 b).

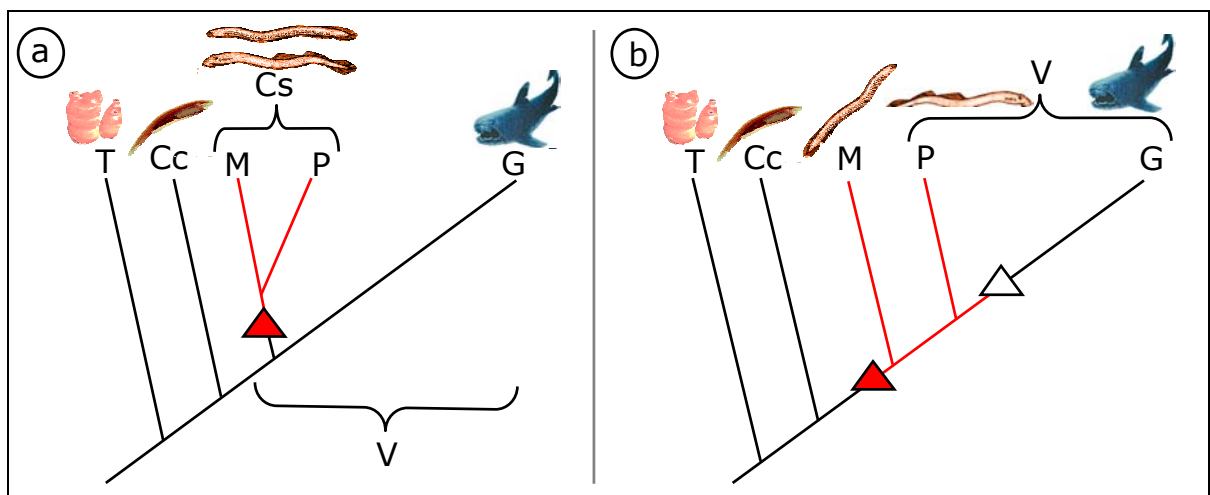


Abb. 34 Drei-Taxa-Problem zwischen den Myxinoiden (Schleimaale), Petromyzontoiden (Neunaugen) und gnathostomen Vertebraten. (a) Cyclostomaten-Hypothese und (b) Vertebraten-Hypothese bezüglich der $K\alpha/K\gamma$ -Proteine von Neunauge und Schleimaal. T: Tunicata, Cc: Cephalochordata, M: Myxinoidea, P: Petromyzontoidae, G: Gnathostomata, V: Vertebrata, Cs: Cyclostomata. Das rote Dreieck symbolisiert die Entstehung, das weiße Dreieck den Verlust der $K\alpha/K\gamma$ -Proteine.

Die Sequenzierung der „normalen“ IF-Proteine von *Eptatretus stouti* oder eines anderen Vertreters der Schleimaale würde mit Sicherheit dazu beitragen, noch mehr Aufschluss über die Verwandtschaftsverhältnisse der niederen Wirbeltiere zu erlangen. Sie könnten jedoch darüber hinaus auch dazu beitragen, die noch nicht vollständig geklärten Fragen der IF-Protein-Evolution wie bspw. die Entwicklung und Abstammung der einzelnen IF-Typen der Vertebraten oder die Herkunft der K8/18-orthologen Keratine zu beantworten.

E Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden über cDNA-Banken und RT-PCR erstmals Intermediärfilament-Proteine (IF-Proteine) des Flussneunauges *Lampetra fluviatilis* (Agnatha, kieferlose Wirbeltiere) kloniert und sequenziert. Die 15 ermittelten Primärstrukturen unterteilen sich in drei Typ I-Keratine und drei Typ I-keratinartige IF-Proteine (K γ), vier Typ II-Keratine und zwei Typ II-keratinartige IF-Proteine (K α), die Typ III-Proteine Vimentin und Desmin sowie ein Typ IV-Neurofilament-Protein (NF). Von einem weiteren möglichen IF-Protein (II α) wurde ein Genfragment über PCR kloniert und sequenziert. Dem Desmin-Klon fehlt die für die Head-Domäne codierende cDNA und der 3'-untranslatierte Bereich. Einem der Typ II-Keratine (K2) fehlt ein kleiner Teil der für die Head-Domäne codierenden DNA. Die übrigen Sequenzen liegen als vollständig codierende cDNA-Klone vor.

Biochemisch wurden die Cytoskelett-Proteine aus verschiedenen Organen (Epidermis, Saugmund, Kieme, Darm, Herz) isoliert und durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) aufgetrennt. Durch die Anwendung des komplementären Keratin-Blot-Bindungstests und Immunblots wurden innerhalb der erhaltenen Polypeptidmuster verschiedene Typ I- und Typ II-Keratine sowie Vimentin und Desmin identifiziert und charakterisiert. Dabei tauchte noch ein viertes Typ I-Keratin auf, dessen Expression nur im Saugmund stattfindet. Die massenspektrometrische Analyse (MALDI-MS) tryptisch verdauter Proteine aus der 2D-PAGE ermöglichte in Kombination mit den Sequenzdaten die biochemische Identifizierung von Vimentin, Desmin sowie aller sequenzierten Keratine bis auf zwei der fünf K α /K γ -Proteine. Entsprechend ihrer gewebespezifischen Expression wurden IS- und IIS-Keratine („S“ von „simple epithelial“) von IE- und IIE-Keratinen („E“ von „epidermal“) unterschieden und den Sequenzdaten zugewiesen. Das Flussneunauge besitzt alle vier Typen: ein IS-Keratin (K18), zwei IIS-Keratine (K3 und K8), zwei IE-Keratine (K10 und K11) und ein IIE-Keratin (K1). Das sowohl in einfachen als auch in epidermalen Epithelien auftretende Typ II-Keratin K2 sowie das nur im Saugmund nachgewiesene Typ I-Keratin lassen sich nicht eindeutig den Kategorien „E“ und „S“ zuordnen.

Von den sequenzierten Keratinen ist das IIS-Keratin K8 wahrscheinlich ortholog zu den bekannten K8-Sequenzen höherer Vertebraten. Die übrigen Typ II-Keratine und die sequenzierten Typ I-Keratine haben offensichtlich keine direkten Korrelate unter den bis jetzt bekannten IF-Proteinsequenzen der Chordaten. Die Typ I-Keratine unterscheiden sich innerhalb der konservierten helikalen Rod-Domäne nur wenig voneinander. Die Bezeichnung K18 für das einzige IS-Keratin des Neunauges in Anlehnung an das IS-Keratin K18 des Menschen basiert auf der stets beobachteten Koexpression mit K8 in einfachen Epithelien. In molekularen Keratin-Stammbäumen der Gnathostomier können K8 und K18 des Neunauges gut als Außengruppe definiert werden.

Die Sequenz des Neunaugen-Vimentins zeigt große Übereinstimmungen mit den bekannten Desminsequenzen der Vertebraten. Durch biochemische Analysen, Identifizierung mittels MALDI-MS und nicht zuletzt auch durch die Sequenzierung des Neunaugen-Desmins konnte das Protein zweifelsfrei charakterisiert werden. Das identifizierte Neurofilament-Protein, vermutlich ein NF_L (light) ist das erste bekannte Typ IV-Protein, bei dem die C-terminale Tail-Domäne sehr kurz ausfällt (neun Aminosäuren). Neben einem Neurofilament-Protein des Meeresneunauges *Petromyzon marinus* ist es die zweite bekannte Typ IV-IF-Proteinsequenz der Agnathen. Auch Vimentin, Desmin und NF_L eignen sich gut als Außengruppe für die Stammbaumanalyse des jeweiligen IF-Typs innerhalb der gnathostomen Wirbeltiere.

Die keratinartigen Proteine $K\alpha$ und $K\gamma$ waren zu Beginn meiner Arbeit nur von dem Agnathen *Eptatretus stouti* (Pazifischer Schleimaal) bekannt. Bei diesem bilden sie auf Heterodimeren basierende, fadenförmige Filamente, welche die Eigenschaften des extracorporalen Schleims beeinflussen. Die beim Neunauge nachgewiesene epidermale Expression von mindestens drei der fünf sequenzierten Proteine kann als Hinweis auf eine vergleichbare Funktion angesehen werden. Die Primärstrukturen von $K\alpha$ und $K\gamma$ weisen, obwohl stark abgeleitet, Gemeinsamkeiten sowohl mit den Keratinen als auch mit den Typ III-Proteinen auf. Da ihr spezifisches Auftreten nach heutiger Kenntnis auf Agnathen beschränkt ist, können sie als Synapomorphie der Neunaugen und Schleimaale gewertet werden. Die daraus resultierenden Konsequenzen für die Verwandtschaftsverhältnisse der Agnathen und kiefertragenden Wirbeltiere werden diskutiert.

F Anhang

1. Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BNHS	Biotinyl-N-hydroxysuccinimid
cDNA	copy- oder auch complement-DNA
CI	Chloroform-Isoamylalkohol
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (double strand DNA)
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
H ₂ O _{bidest}	Bidestilliertes Wasser
Ig	Immunglobulin, Antikörper
IF	Intermediärfilament
IPTG	Isopropyl-β-D-Galactosid
JTT	Jones-Taylor-Thornton Matrix
kb	Kilobasen (1000 Nukleotide)
kDa	Kilodalton, 10 ³ Dalton
Lfl, <i>lfl</i>	<i>Lampetra fluviatilis</i> (Flussneunauge)
MMLV-RT	Moloney murine leukemia virus Reverse Transkriptase
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäure Natriumsalz
mRNA	Messenger RNA
MYA	Million years ago
NBT	p-Nitrobluetetrazoliumchlorid
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
pfu	Plauebildende Einheiten (plaque forming units)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>RT</i>	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure (single strand DNA)
TBS/TBST	Tris-Buffered-Saline / and Tween
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UTR	Untranslatierter Bereich (untranslated region)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (volume/volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight/volume)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galctosid

2. *Verwendete Kurzbezeichnungen der IF-Proteine und EMBL-Accession-Nr.*

<u>Bezeichnung</u>	<u>Accession- Nummer</u>	<u>Artname</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Accession- Nummer</u>	<u>Artname</u>
Cytoplasmatische IF-Proteine der Protostomier			Typ II-Keratine i. w. S.		
Alu-IFD1	X86091	<i>Ascaris lumbricus</i>	Aba-K1hb1	--	<i>Acipenser baeri</i>
Cel-IF_B2	X78553	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Bfl-D1	AJ223581	<i>Branchiostoma floridae</i>
Gpy-IF	AJ005004	<i>Glottidia pyramidata</i>	Bla-D1	AJ223579	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>
Has-IF_B	X55947	<i>Helix aspersa</i>	Bla-E2	AJ010293	
Has-IF_nf	X86347		Cau-K8	M87773	<i>Carassius auratus</i>
Hme-IF	AF101063	<i>Hirudo medicinalis</i>	Dre-K"8"	--*	<i>Danio rerio</i>
Lte-IF	X83734	<i>Lumbricus terrestris</i>	Dre-KII_af19	AF197909	
Odo-IF	L10113	<i>Octopus dofleini</i>	Dre-KII_af13	AF134850	
Pva-IF	AJ004936	<i>Phoronis vancouverensis</i>	Est-Ka	U11865	<i>Eptatretus stouti</i>
Sel-IF 1	AJ004932	<i>Sagitta elegans</i>	Gga-K_oto	AF072698	<i>Gallus gallus</i>
Sel-IF 2	AJ005019		Lfl-K1	AJ401159	<i>Lampetra fluviatilis</i>
Lamine (Typ V)			Lfl-K2	AJ308115	
Bla-La	AJ271077	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	Lfl-K3	AJ308113	
Cel-La1	X74027	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Lfl-K8	AJ308114	
Cin-La L2	AJ251957	<i>Ciona intestinalis</i>	Lfl-Ka1	AJ289859	
Dme-La	X16275	<i>Drosophila melanogaster</i>	Lfl-Ka2	AJ308120	
Hat-La	AJ005934	<i>Hydra attenuata</i>	Hsa-K1	AF237621	<i>Homo sapiens</i>
Hsa-La_B1	M34458	<i>Homo sapiens</i>	Hsa-K2	AF019084	
Xla-La B2	AF077839	<i>Xenopus laevis</i>	Hsa-K8	BC000654	
IF-Proteine der Chordaten			Hsa-K Hb2	Y19207	
Typ I-Keratine i. w. S.			Mmu-K8	D90360	<i>Mus musculus</i>
Aba-K18	--	<i>Acipenser baeri</i>	Nvi-K8	AJ001296	<i>Notophthalmus viridescens</i>
Aba-K1ga1	--		Nvi-KII	AJ001295	
Aba-K1ha1	--		Omy-K1	AJ272369	<i>Onchorynchus mykiss</i>
Aba-K2fk1	--		Omy-K2	AJ272370	
Aba-K_5d2	--		Omy-K3	AJ315933	
Bfl-IF1	AF108192	<i>Branchiostoma floridae</i>	Omy-K8 a	AJ272373	
Bla-K1	AJ245426	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	Omy-K8 b	X92522	
Bla-E1	AJ010294		Pse-K8	--	<i>Polypterus senegalus</i>
Bla-Y1	AJ245428		Ptr-K8	X70987	<i>Potorous tridactylus</i>
Bta-K_vib	X02870	<i>Bos taurus</i>	Rca-K8	AB056480	<i>Rana catesbeiana</i>
Cau-K18	L09744	<i>Carassius auratus</i>	Rca-K_ie	AF229168	
Cau-K49	L09743		Rca-K_rlk	AB050956	
Cau-K50	M86918		Rno-K8	M63482	<i>Rattus norvegicus</i>
Dre-KI_af08	AF084461	<i>Danio rerio</i>	Sst-K1	Y17257	<i>Scylliorhinus stellaris</i>
Dre-KI_af19	AF197880	<i>Danio rerio</i>	Sst-K8	Y14648	
Est-Ky	U20546	<i>Eptatretus stouti</i>	Xla-K8	M13811	<i>Xenopus laevis</i>
Gga-K19	AB016281	<i>Gallus gallus</i>	Xla-K55	X14427	
Hsa-K9	X75015	<i>Homo sapiens</i>	Xla-K_xlk	AB045599	
Hsa-K17	Z19574		Typ III- u. Typ IV-Proteine		
Hsa-K18	BC000698		Aba-D	--	<i>Acipenser baeri</i>
Hsa-K20	X73501		Aba-V	--	
Hsa-K_HA1	Y16787		Bfl-B1	AJ223580	<i>Branchiostoma floridae</i>
Hsa-Kha 7	Y16793		Bla-B1	X64522	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>
Lfl-K10	AJ308116	<i>Lampetra fluviatilis</i>	Bta-D	AB011675	<i>Bos taurus</i>
Lfl-K11	AJ308117		Bta-NF_M	U83919	
Lfl-K18	AJ308118		Bta-V	L13263	
Lfl-Ky1	AJ289860		Cin-A2	AJ298329	<i>Ciona intestinalis</i>
Lfl-Ky2	AJ308111		Cau-Ge	L19595	<i>Carassius auratus</i>
Lfl-Ky3	AJ308112		Cau-GFAP	L23876	
Moc-D1	AJ417906	<i>Molgula oculata</i>	Cau-V	L23841	
Mmu-K15	D16313	<i>Mus musculus</i>	Cca-V	S76850	<i>Cyprinus carpio</i>
Mmu-K18	M22832		Cco-NF_L	D13223	<i>Coturnix coturnix</i>
Omy-K10	AJ272372	<i>Onchorynchus mykiss</i>	Cgr-V	M16718	<i>Cricetulus griseus</i>
Omy-K11	AJ272371		Dre-D	U47113	<i>Danio rerio</i>
Omy-K12	--		Dre-Ge	U89710	
Omy-K13	--		Dre-Pl	U89709	
Omy-K18	Y14289		Dre-V	AF069994	
Pse-K10	--	<i>Polypterus senegalus</i>	Gga-D	AB011672	<i>Gallus gallus</i>
Pse-K11	--		Gga-V	M15852	
Pse-K13	--		Hsa-D	M63391	<i>Homo sapiens</i>
Pse-K18	--		Hsa-GFAP	BC013596	
Pse-S70	--		Hsa-NF_L	X05608	
Sd-D1	AJ271146	<i>Styela clava</i>	Hsa-NF_M	Y00067	
Sst-K18	Y14647	<i>Scylliorhinus stellaris</i>	Hsa-V	M14144	
Xla-K18	Y00230	<i>Xenopus laevis</i>	Lfl-D	AJ308121	<i>Lampetra fluviatilis</i>
Xla-XK70	M11032		Lfl-NF_L	AJ308119	

<u>Bezeichnung</u>	<u>Accession-Nummer</u>	<u>Artname</u>
Typ III- u. Typ IV –Proteine (Fortsetzung)		
Lfl-V	AJ278487	<i>Lampetra fluviatilis</i>
Mau-D	K02407	<i>Mesocricetus auratus</i>
Mau-V	K00927	
Mmu-D	L22550	<i>Mus musculus</i>
Mmu-GFAP	AF332062	
Mmu-NF_L	X02165	
Mmu-V	M24849	
Omy-D	AJ304373	<i>Onchorynchus mykiss</i>
Omy-V	Z50738	
Pma-NF180	U19361	<i>Petromyzon marinus</i>
Pse-D	--	<i>Polypterus senegalus</i>
Pse-V	--	
Rno-D	X73524	<i>Rattus norvegicus</i>
Rno-GFAP	AF028784	
Rno-NF_L	AF031880	
Rno-V	X62952	
Scl-A1	AJ271143	<i>Styela clava</i>
Spl-A1	AJ005020	<i>Styela plicata</i>
Scs-D	AB011676	<i>Sus scrofa</i>
Scs-NF_L	P02547	
Sst-D	Y15064	<i>Scyliorhinus stellaris</i>
Sst-V	AJ243830	
Tca-NF_M	PN0009	<i>Torpedo californica</i>
Tca-V	X51533	
Dru-V	--**	<i>Daboia russellii</i>
Xla-D	X16842	<i>Xenopus laevis</i>
Xla-NF_L	M86654	
Xla-P	X16570	
Xla-V1/2	X16843	
Xla-V4	X16844	
Xla-XNIF	M86653	
Typ VI-IF-Proteine		
Gga-Para	U59287	<i>Gallus gallus</i>
Gga-Syne	U28143	
Gga-Trans	X80877	
Hsa-Nes	X65964	<i>Homo sapiens</i>
Hsa-Syne	AF359284	
(«Desmuslin»)		
Mmu-Nes	AF076623	<i>Mus musculus</i>
Rno-Nes	M34384	<i>Rattus norvegicus</i>
Xla-Tana	M99387	<i>Xenopus laevis</i>

<u>Bezeichnung</u>	<u>Accession-Nummer</u>	<u>Artname</u>
weitere IF-Proteine der Tunicaten u. Acranier		
Bfl-A1	AJ223574	<i>Branchiostoma floridae</i>
Bfl-A2	AJ223582	
Bfl-A3	AJ223575	
Bfl-B2	AJ223576	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>
Bla-C1	AJ223578	
Bla-X1	AJ245427	
Cin-B2	AJ298330	<i>Ciona intestinalis</i>
Cin-C2	AJ298331	
Cin-D2	AJ298332	
Cin-F2	AJ298333	
Moc-C1	AJ417905	<i>Molgula oculata</i>
Scl-B1	AJ271144	<i>Styela clava</i>
Scl-C1	AJ271145	
Spl-B1	AJ005021	<i>Styela plicata</i>

IF-Protein-Abkürzungen

A1-F2	IF-Proteine der Tunicaten und Acranier
D	Desmin
Ge	Gefiltin
GFAP	Saures Gliafilamentprotein
K	Keratin
Ka, Ky	Keratinartige IF-Proteine der Agnathen
KHa	Haarkeratin Typ I (Hair acidic)
KHb	Haarkeratin Typ II (Hair basic)
La	Lamin
NF_L_M_H	Neurofilament-Protein (light, medium, high)
Nes	Nestin
P	Peripherin
Para	Paranemin
PI	Plasticin
Syne	Synemin
Tana	Tanabin
Trans	Transitin
V	Vimentin

<http://www.ebi.ac.uk/embl/>

-- Ergebnisse der Arbeitsgruppe - noch nicht in Datenbank

* Sequenz nicht in Datenbank; aus Imboden et al. (1997)

** Sequenz noch nicht in Datenbank; zur Verfügung gestellt von Tolstonog et al. (2001)

3. *Verwendete PCR-Primer*

Name	US/DS (upstream/ downstream)	Sequenz in 5' - 3' Orientierung
AAP (abridged anchor primer)	US	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GI IGG GII G
atg-typ 1	US	CNA TGK CCT YAC TCM Y
lfl-d_d_5b	US	GAR AAG GYN GAG NTG CAR SAB CT
des	US	CAG TCC TAC ACC TGC GAG ATH GA
maldides2	US	ATY GAR TCN CTN AAY GAR GA
Omy-deshead	US	TCC TCY TAC CGC CGC ACY TTY GG
Typ I rodstart	US	CYT GAA YSA SCG YYT GGC
Typ II K8	US	RD GAG AAR GAV CAG ATY AA
typ2	US	ATY GCH GAD GCH GAG SAR CGY GG
typ3	US	GAR GAV TGG TAY AAR TCH AAR
vim	US	TTT GCT GAC CTS TCN GAR GCT GC
desmaldi-rc	DS	GCR ATY TCN ACR TCV AGN GCC AT
endrod	DS	TCY TCB CCY TCC AGS AGY TTC CTG TA
ID-endrod	DS	GTA RGT GGC RAT YTC VAY RTC MAG
K2-UTR	DS	CAC CRS YCA GNT YCW C
Linker-Primer	DS	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAG-d(T)18
Omydestail	DS	CTC RCT SAC SAC CTC NCC ATC
Poly d(T)	DS	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
Typ I endrod	DS	GTA KGT BGC WAT YTC MRC HTC SAG

4. *IUPAC-Code Nukleinsäuren*

Code	Beschreibung	Code	Beschreibung
A	Adenin	M	C oder A
C	Cytosin	K	T, U, oder G
G	Guanin	W	T, U, oder A
T	Thymin	S	C oder G
U	Uracil	B	C, T, U, oder G (nicht A)
I	Inosin	D	A, T, U, oder G (nicht C)
R	Purine (A oder G)	H	A, T, U, oder C (nicht G)
Y	Pyrimidine (C, T, oder U)	V	A, C, oder G (nicht T, nicht U)
N	Jede Base (A, C, G, T oder U)		

5. IUPAC-Code und Masse der Aminosäuren (im Protein)

Masse (-H ₂ O) ↓				Masse (-H ₂ O) ↓			
A	Ala	Alanin	71.079	M	Met	Methionin	131.199
C	Cys	Cystein	103.145	N	Asn	Asparagin	114.104
D	Asp	Aspartat	115.089	P	Pro	Prolin	97.117
E	Glu	Glutamat	129.116	Q	Gln	Glutamin	128.131
F	Phe	Phenylalanin	147.177	R	Arg	Arginin	156.188
G	Gly	Glycin	57.052	S	Ser	Serin	87.078
H	His	Histidin	137.141	T	Thr	Threonin	101.105
I	Ile	Isoleucin	113.160	V	Val	Valin	99.133
K	Lys	Lysin	128.17	W	Trp	Tryptophan	186.213
L	Leu	Leucin	113.160	Y	Tyr	Tyrosin	163.176

6. Der genetische Code für Eukaryoten

Position	2nd				
1st	T	C	A	G	3rd
T	F Phe	S Ser	Y Tyr	C Cys	T
	F Phe	S Ser	Y Tyr	C Cys	C
	L Leu	S Ser	Stop	Stop	A
	L Leu	S Ser	Stop	W Trp	G
C	L Leu	P Pro	H His	R Arg	T
	L Leu	P Pro	H His	R Arg	C
	L Leu	P Pro	Q Gln	R Arg	A
	L Leu	P Pro	Q Gln	R Arg	G
A	I Ile	T Thr	N Asn	S Ser	T
	I Ile	T Thr	N Asn	S Ser	C
	I Ile	T Thr	K Lys	R Arg	A
	M Met	T Thr	K Lys	R Arg	G
G	V Val	A Ala	D Asp	G Gly	T
	V Val	A Ala	D Asp	G Gly	C
	V Val	A Ala	E Glu	G Gly	A
	V Val	A Ala	E Glu	G Gly	G

7. MALDI-MS-Tabellen

Vergleich der MALDI-MS-Daten der analysierten Proteinflecken mit dem Spektrum einer theoretisch tryptisch verdauten IF-Proteinsequenz. **Rot** sind oxidierte Methionine bzw. deren theoretische Masse dargestellt (MSO, Masse + ~16). Fragmente mit einer übersprungenen tryptischen Schnittstelle sind **blau**, Fragmente mit zwei übersprungenen tryptischen Schnittstellen **grün** dargestellt. Die Proteinfleck-Nr. bezieht sich auf das Gewebe, aus dem das Protein isoliert wurde (vgl. Abb. 23). Positionen aus unvollständigen Sequenzen sind mit (*) gekennzeichnet.

7.1 Typ I-Keratine

- Lfl-K10 – Proteinflecke D1, D2, K2, K3 und E2

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse(n)	Fleck-Nr.
1	6-16	<STSSVNLGGNR>	1091,54	1091,46 1091,49 1091,48	K2 K3 E2
2	18-39	<SYSASMHGSGGGGGYGGGSISR>	1958,84	1958,83	E2
3	18-39	<SYSAS M HGSGGGGGYGGGSISR>	1958,84 MSO→ 1974,84	1974,87 1974,82 1974,83 1974,84 1974,80	D1 D2 K2 K3 E2
4	94-102	<LE M QGLNDR>	1075,52 MSO→ 1091,51	1091,46 1091,49 1091,48	K2 K3 E2
5	112-118	<FLEGANR>	806,41	806,42 806,42 806,41	K2 K3 E2
6	144-149	<IMDDL R >	778,37 MSO→ 762,38	778,34	K2
7	144-151	<IMDDL R AK>	961,51	961,51	E2
8	152-161	<ILAQILENAR>	1140,67	1140,63 1140,64 1140,65	K2 K3 E2
9	162-170	<ISLEIDNAR>	1030,55	1030,52 1030,54	K3 E2
10	171-177	<LAADDFR>	807,40	807,41	D1
11	178-187	<TKWETELAL R >	1246,68	1246,63	E2
12	180-187	<WETELAL R >	1017,53	1017,50 1017,51 1017,53	K2 K3 E2
13	188-198	<SSVEADINN L R>	1217,61	1217,57 1217,55 1217,58 1217,56	D2 K2 K3 E2
14	199-208	<GLLDEYN M AR>	1181,56	1181,53 1181,55 1181,57	K2 K3 E2
15	199-208	<GLLDEYN M AR>	1181,56 MSO→ 1197,55	1197,50 1197,48 1197,49 1197,50 1197,47	D1 D2 K2 K3 E2
16	209-219	<MGLEGEIES L R>	1233,61 MSO→ 1249,61	1249,54 1249,53 1249,53 1249,53	D1 D2 K2 E2
17	220-226	<EELHF M R>	961,456	961,51	E2
18	220-226	<EELHF M R>	961,45 MSO→	977,41 977,41	D1 D2

			977,45	977,41 977,43 977,39	K2 K3 E2
19	227-237	<KNHEEELAALR>	1309,69	1309,62 1309,62 1309,62 1309,64	D2 K2 K3 E2
20	228-237	<NHEEELAALR>	1181,59	1181,53 1181,55 1181,57	K2 K3 E2
21	260-265	<ILAEIR>	714,45	714,46 714,46	K2 K3
22	277-285	<ADQEEAFKK>	1065,52	1065,52 1065,54 1065,52 1065,53 1065,54	D1 D2 K2 K3 E2
23	313-326	<RAMQSLQAELDSLRL>	1617,84 MSO→ 1633,83	1633,77 1633,77	K2 K3
24	314-326	<AMQSLQAELDSLRL>	1461,74 MSO→ 1477,73	1477,65 1477,64 1477,63	K2 K3 E2
25	331-342	<SLDDQLQDTEDR>	1434,63	1434,57 1434,57 1434,55	K2 K3 E2
26	346-356	<ELSSYTIIIQR>	1322,73	1322,67 1322,66 1322,66 1322,66 1322,66	D1 D2 K2 K3 E2
27	357-365	<LEGDLNNMR>	1061,50 MSO→ 1077,50	1077,45	K2
28	385-393	<LEAEIATYR>	1065,56	1065,52 1065,54 1065,52 1065,53 1065,54	D1 D2 K2 K3 E2
29	486-495	<QQNPGVA AVR>	1039,56	1039,53 1039,54 1039,54	K2 K3 E2
30	505-527	<TVIITQTIIDGQVVQESQEVSEK>	2544,34	2544,37 2544,38 2544,33	K2 K3 E2

- Lfl-K11 – Proteinflecke E6 und K5

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse(n)	Fleck-Nr.
1	7-17	<SIGGYGGMSTR>	1085,50 MSO→ 1101,50	1101,41	E9
2	21-36	<GSASVYEGGGSSGGYR>	1490,65	1490,61 1490,59	E9 K6
3	82-96	<GGGAGGGGLSGGNEK>	1174,55	1174,56	E9
4	115-126	<FLENANQELELR>	1475,75	1475,71 1475,68	E9 K6
5	140-152	<DYSAYTTMQELR>	1640,73 MSO→ 1656,72	1656,64 1656,68	E9 K6
6	153-164	<DKILAQIMENAR>	1401,75 MSO→ 1417,75	1417,66	E9
7	155-164	<ILAQIMENAR>	1158,63 MSO→ 1174,63	1174,56	E9

8	165-173	<VSLEIDNAR>	1016,54	1016,53	E9
9	174-180	<LAADDFR>	807,40	807,39 807,43	E9 K6
10	181-190	<SKWETELALR>	1232,66	1232,63 1232,60	E9 K6
11	191-201	<SSVEADINNLR>	1217,61	1217,60 1217,55	E9 K6
12	202-211	<GLLDEYSMAR>	1154,55 MSO→ 1170,55	1170,47 1170,49	E9 K6
13	212-222	<MGLEGEIESLR>	1233,61 MSO→ 1249,61	1249,55 1249,53	E9 K6
14	212-229	<MGLEGEIESLREELIFMR>	2152,08 2 × MSO→ 2184,07	2184,07	E9
15	223-229	<EELIFMR>	937,48 MSO→ 953,48	953,42 953,46	E9 K6
16	230-240	<KNHEEELAALR>	1309,69	1309,66 1309,61	E9 K6
17	231-240	<NHEEELAALR>	1181,59	1181,57 1181,54	E9 K6
18	263-268	<ILAEVR>	700,44	700,38	E9
19	278-288	<NRVDQEEAFNK>	1349,64	1349,61 1349,58	E9 K6
20	289-308	<QAQSVQVVAVQHSQASQAAK>	2065,08	2065,07	E9
21	316-329	<RAMQSLQAELDSLRL>	1617,84 MSO→ 1633,83	1633,73 1633,77	E9 K6
22	334-345	<SLEDQLQDTEER>	1462,67	1462,63 1462,59	E9 K6
23	349-359	<DLSTYTMQIQR>	1355,66 MSO→ 1371,66	1371,58 1371,58	E9 K6
24	360-368	<LEGELSNLR>	1030,55	1030,56	E9
25	369-376	<HGINQQLK>	937,52	937,45	E9
26	386-396	<MKLEAEIATYR>	1324,69 MSO→ 1340,69	1340,58	E9
27	398-405	<LLEGEDSR>	918,45	918,45	E9
28	472-481	<ESSYSTGYR>	1136,48	1136,46	E9

- Lfl-K18 – Proteinflecke D11 und H5

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse(n)	Fleck-Nr.
1	5-19	<SYSSASAYGGGSVSR>	1435,64	1435,57 1435,56	D11 H5
2	82-95	<VRFLEGANQELELK>	1645,89	1645,73	D11
3	84-95	<FLEGANQELELK>	1390,72	1390,59	H5
4	109-121	<DYSAYYPIIEDLR>	1617,77	1617,72 1617,73	D11 H5
5	124-133	<ILAQILENAR>	1140,67	1140,63	D11
6	152-159	<WETELALR>	1017,53	1017,43	H5
7	160-170	<SSVEADINNLR>	1217,61	1217,55	D11
8	171-180	<GLLDEYNMAR>	1181,56	1181,53 1181,43	D11 H5
9	171-180	<GLLDEYNMAR>	1181,56 MSO→ 1197,56	1197,48 1197,42	D11 H5
10	181-191	<MGLEGEIESLR>	1233,61 1249,61	1249,52 1249,46	D11 H5

11	181-198	<M G LEGEIESLREELLFLK>	2106,11 MSO→ 2122,11	2122,10	D11
12	199-209	<KNHEEELAALR>	1309,68	1309,58	D11
13	200-209	<NHEEELAALR>	1181,59	1181,53 1181,43	D11 H5
14	286-298	<SMQSLQAELDSL R >	1477,73 MSO→ 1493,72	1493,61	D11
15	303-314	<SLEQQ L QDTE D R>	1461,68	1461,56	H5
16	318-328	<ELSGYTSV I HR>	1261,65	1261,57 1261,52	D11 H5
17	329-337	<LEGELNNLR>	1057,56	1057,53	D11
18	357-365	<LEEEIATY R >	1123,56	1123,54 1123,41	D11 H5

7.2 Typ II-Keratine

- Lfl-K1 – Proteinflecke E4, E5 und K4

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse(n)	Fleck-Nr.
1	35-52	<SGGFSSHSQFGGGGGSR>	1625,70	1625,64 1625,66 1625,65	E4 E5 K4
2	59-93	<SGGSSYGGGGGGFGG ISASFSSQVAAGPPPEIDR>	3127,43	3127,45 3127,40	E4 K4
3	129-135	<VLEAQWR>	901,48	901,49 901,46	E5 K4
3	129-135	<VLEAQWR>	901,48	901,49 901,46	E5 K4
4	141-159	<GSGGSNLDLFEAYINGLK>	1941,95	1941,92	K4
5	160-169	<QHLDGLGNEK>	1110,55	1110,49 1110,49	E5 K4
6	190-197	<YEEEINTR>	1053,48	1053,47 1053,46	E5 K4
7	225-236	<LDGLNDEIEFLK>	1405,72	1405,66 1405,64 1405,64	E4 E5 K4
8	238-244	<IFAEELR>	877,48	877,47 877,49 877,50	E4 E5 K4
9	264-275	<NLDVDGLIADVR>	1299,69	1299,62 1299,63 1299,61	E4 E5 K4
10	276-283	<AQYEAM R >	939,43 MSO→ 955,43	955,42 955,41	E5 K4
12	316-323	<NEINELNR>	1001,50	1001,48 1001,48	E5 K4
13	330-337	<AEIEALKK>	901,53	901,49 901,46	E5 K4
14	340-352	<AQLEAAISEA E GR>	1344,67	1344,60 1344,62 1344,61	E4 E5 K4
15	359-366	<EAK E TIAR>	917,50	917,47	K4
16	376-383	<QQMA Q HVR>	997,50 MSO→ 1013,49	1013,48	E5

17	393-403	<LALDIEIATYR>	1277,71	1277,66 1277,64 1277,63	E4 E5 K4
----	---------	---------------	---------	-------------------------------	----------------

• Lfl-K2 (Fragment)– Proteinflecke D12, K8, S4, S5 und E8

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse(n)	Fleck-Nr.
1	4-14*	<RSTALGGSSYR>	1154,59	1154,56	S4
2	5-14*	<STALGGSSYR>	998,49	998,48 998,50 998,49	K8 S4 S5
3	75-83*	<FANFIDKVR>	1109,61	1109,58	S4
4	84-90*	<FLEQQNK>	906,47	906,46	K8
5	91-102*	<VLEAQWYALQEK>	1477,77	1477,72	S4
6	103-121*	<TTTGSSVDE ^M FEAYINGLR>	2090,97 MSO→ 2106,97	2107,03	K8
7	103-122*	<TTTGSSVDEMFEAYINGLRR>	2247,07 MSO→ 2263,07	2263,14	E8
8	132-149*	<GQLNGNLGQM ^Q AVVEDFR>	1975,97	1976,05 1976,06	S4 S5
9	132-149*	<GQLNGNLGQM ^M AVVEDFR>	1975,97 MSO→ 1991,96	1992,01 1991,96	S4 E8
10	160-171*	<NAAEGEFVVVKK>	1290,70	1290,65	S4
11	172-186*	<DVDGAYLSKVELETR>	1694,86	1694,87	S4
12	181-186*	<VELETR>	746,40	746,43 746,43	K8 S4
13	187-198*	<LQGLVDEINFLR>	1416,78	1416,74 1416,77 1416,80 1416,68	K8 S4 S5 E8
14	199-213*	<SIFTQELSELEAIK>	1735,91	1735,91	S4
15	214-225*	<HTNVLVEIDNSR>	1396,72	1396,70	S4
16	226-237*	<NLDIDGIIADVR>	1313,70	1313,64 1313,54 1313,43	K8 S4 E8
17	238-246*	<HQYETIAAR>	1088,55	1088,57 1088,53 1088,54 1088,54 1088,44	D12 K8 S4 S5 E8
18	247-258*	<SRAEADAFYQDK>	1400,64	1400,64	S4
19	249-258*	<AEADAFYQDK>	1157,51	1157,52	K8
20	259-268*	<FQSLHSDSGR>	1133,53	1133,51 1133,54 1133,43	K8 S4 E8
21	269-274*	<NDEELR>	775,36	775,38 775,37 775,39	D12 K8 S4
22	275-285*	<MTKTEITELNR>	1335,69 MSO→ 1351,69	1351,65	K8
23	275-289*	<MTKTEITELNR ^Q MQR>	1878,95 2 × MSO→ 1910,94	1910,90	D12
24	275-285*	<MTKTEITELNR>	1335,69 MSO→ 1351,69	1351,65 1351,68 1351,69 1351,59	K8 S4 S5 E8
25	278-285*	<TEITELNR>	975,51	975,52 975,51 975,52	D12 K8 S4

				975,52	S5
26	292-299*	<AEMEALKK>	919,49 MSO→ 935,49	935,50	S4
27	302-314*	<AKLESAIAEAEGR>	1344,71	1344,70 1344,71 1344,59	S4 S5 E8
28	304-314*	<LESAIAEAEGR>	1145,58	1145,56 1145,55 1145,56	D12 K8 S4
29	324-335*	<AAIAQLEEEIHK>	1351,72	1351,65 1351,68 1351,69 1351,59	K8 S4 S5 E8
30	367-374*	<LLEGEESR>	932,47	932,48	S4

• Lfl-K3 – Proteinflecke H4, D8, D9 und K7

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse(n)	Fleck-Nr.
1	16-25	<ISVGGSGGSR>	876,45	876,46	K7
2	26-37	<GFSSASLSAGGR>	1096,53	1096,42 1096,50 1096,50 1096,52	H4 D8 D9 K7
3	52-77	<SGGGGFGGFSASSAAMLGPPPEIDR>	2409,11 MSO→ 2425,11	2425,12 2425,12 2425,15	D8 D9 K7
4	78-83	<SVLPVR>	670,42	670,46	D9
5	97-103	<FANFIDK>	854,44	854,44	K7
6	113-119	<VLEAQR>	901,49	901,50	K7
7	125-140	<GTVVSGLDGLFDAYTR>	1670,83	1670,82 1670,79 1670,79 1670,80	H4 D8 D9 K7
8	154-171	<LGLQNELQAMQGHVEDFK>	2057,01 MSO→ 2073,00	2073,00	K7
9	174-181	<YEEEINTR>	1053,48	1053,37 1053,47 1053,45 1053,48	H4 D8 D9 K7
10	172-181	<TKYEEEINTR>	1282,62	1282,60	K7
11	194-202	<DVDDAFLNK>	1036,49	1036,47	K7
12	209-221	<LEALQDEIEFLKK>	1575,86	1575,79	K7
13	209-220	<LEALQDEIEFLK>	1447,76	1447,64 1447,66 1447,68 1447,68	H4 D8 D9 K7
14	222-228	<IFTEELR>	907,48	907,43 907,49 907,50 907,50	H4 D8 D9 K7
15	229-247	<QLESQIQDTILTVEIDTSR>	2189,13	2189,12 2189,13 2189,12 2189,15	H4 D8 D9 K7
16	248-259	<NLDVDGLIADVR>	1299,69	1299,57 1299,62 1299,61 1299,64	H4 D8 D9 K7
17	269-278	<SKAESDAFYR>	1173,55	1173,53	K7
18	271-278	<AESDAFYR>	958,42	958,35 958,42 958,42 958,44	H4 D8 D9 K7

19	271-280	<AESDAFYRSK>	1173,55	1173,53	K7
20	281-290	<FADLNAMSGK>	1053,50	1053,37 1053,47 1053,45 1053,48	H4 D8 D9 K7
21	300-307	<SEIADINR>	917,46	917,49	K7
22	314-321	<AEIEALKK>	901,53	901,50	K7
23	324-336	<AQLEAAIAEAEGR>	1328,68	1328,55 1328,61 1328,61 1328,63	H4 D8 D9 K7
24	346-359	<ESLARLEELHQAK>	1652,86	1652,79 1652,77 1652,79	D8 D9 K7
25	351-359	<LEELHQAK>	1096,56	1096,42 1096,50 1096,50 1096,52	H4 D8 D9 K7
26	365-376	<HVHEYQELMNVK>	1526,74 MSO→ 1542,74	1542,65	K7
27	377-387	<LALDIEIATYR>	1277,71	1277,60 1277,65 1277,64 1277,66	H4 D8 D9 K7
28	377-388	<LALDIEIATYRK>	1405,80	1405,73	K7

- Lfl-K8 – Proteinflecke D13, D14 und K6

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse(n)	Fleck-Nr.
1	35-51	<SSAGVLFTGAPPEIDR>	1713,88	1713,86 1713,86 1713,83	D13 D14 K6
2	71-77	<FANFIDK>	854,44	854,43	K6
3	80-85	<SLEQQR>	760,39	760,42	K6
3	86-93	<SVLEAQWK>	960,51	960,44 960,42 960,48	D13 D14 K6
4	103-114	<SNLEDIYQEYIR>	1542,74	1542,62 1542,68	D13 K6
5	119-147	<QLEVLQENKEHLQSDVGHMQGVVEEFKNK>	3392,69	3392,84	D13
6	128-145	<EHLQSDVGHMQGVVEEFK>	2068,97 MSO→ 2084,97	2084,96	K6
7	146-155	<NKYETELNNR>	1280,62	1280,56	K6
8	156-166	<NHAENEFVLIK>	1313,68	1313,60	K6
9	148-155	<YETELNNR>	1038,48	1038,46	K6
10	183-194	<LEGLTDEIDFLR>	1420,73	1420,69 1420,69 1420,65	D13 D14 K6
11	183-195	<LEGLTDEIDFLRR>	1576,83	1576,77	D13
12	196-202	<IYEEELR>	951,47	951,52 951,50 951,48	D13 D14 K6
13	203-221	<ELHAQMNNISLTVEVDITNR>	2184,07 MSO→ 2200,06	2200,07	K6
14	222-233	<HFNMDDIVASVR>	1403,67 MSO→ 1419,66	1402,64	K6
15	234-244	<SQYEALAQQR>	1280,62	1280,56	K6
16	274-281	<QELNDLLR>	1000,54	1000,53	K6
17	285-292	<SLTSEVQR>	919,48	919,49	K6

18	322-333	<IADLEQELADSR>	1359,67	1359,63 1359,61	D14 K6
19	363-370	<LLEGEEDR>	960,46	960,44 960,42 960,48	D13 D14 K6
20	371-378	<LSSLAGAR>	774,44	774,40 774,39	D13 K6
21	384-404	<NYSYSFGDDDLTSHYESAIPR>	2437,05	2437,08	K6

7.3 Keratinartige Proteine

- **Lfl-Ka1 – Proteinfleck E1**

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse	Fleck-Nr.
1	15-37	<YGAQYSGAGLGGVLSNFGGGGSR>	2132,01	2132,00	E1
2	41-48	<FGGVGLAR>	776,44	776,46	E1
3	105-113	<GGGASAALR>	759,41	759,42	E1
4	114-120	<LLSTNFR>	850,48	850,49	E1
5	181-191	<EKQELQVLNDR>	1371,72	1371,68	E1
6	183-191	<QELQVLNDR>	1114,58	1114,56	E1
7	192-198	<FAGFVDK>	783,40	783,40	E1
8	250-260	<AALEAEIDYWK>	1308,65	1308,57	E1
9	201-210	<HLEQQNAILK>	1193,66	1193,59	E1
10	261-269	<GVIQEYAK>	1008,53	1008,47	E1
11	279-288	<SLENEWNTLK>	1233,61	1233,54	E1
12	305-316	<VQGVEDQIDL MK >	1374,69 MSO→ 1390,69	1390,60	E1
13	305-317	<VQGVEDQIDL MKK >	1502,79 MSO→ 1518,78	1518,72	E1
14	361-369	<GHYEALAAK>	959,49	959,48	E1
15	370-381	<SKEDAFSSVQSR>	1340,64	1340,60	E1
16	382-400	<IIQVVGAVQPGNQVLGEAK>	1920,09	1920,08	E1
17	405-415	<SL KMQMDGLRR >	1334,70 MSO→ 1350,70	1350,63	E1
18	408-414	<MQMDGLR>	850,39	850,49	E1
19	408-414	< MQMDGLR >	850,39 2 × MSO→ 882,38	882,35	E1
20	462-477	<QIAQYAQEYQELLANK>	1909,96	1909,94	E1
21	478-488	< MALDIEIAAYR >	1265,65 MSO→ 1281,65	1281,59	E1
22	490-497	<LLDSEEAR>	932,47	932,47	E1

- **Lfl-Ky1 – Proteinfleck E3**

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse	Fleck-Nr.
1	6-23	<VHSSFVEHSTSTPFTASR>	1976,95	1976,96	E3
2	24-40	<LNLSQGPVHTTYSTVSR>	1859,96	1859,97	E3
3	149-170	<GTVGSLGGGRAIPP MMTRETER >	2273,15 2 × MSO→ 2305,14	2305,20	E3
4	242-250	<LEIELDNLR>	1114,61	1114,62	E3
5	258-267	<AKFEFEVGVK>	1153,63	1153,60	E3
6	268-278	<YQLETDIGH MR >	1362,65	1378,56	E3

			MSO→ 1378,64		
7	295-307	<YSMLMEELEFLKR>	1688,84 2 × MSO→ 1720,83	1720,75	E3
8	348-356	<DDYESIAAR>	1039,47	1039,50	E3
9	357-366	<NREEAENYFR>	1327,60	1327,56	
10	359-366	<EEAENYFR>	1057,46	1057,46	E3
11	411-424	<HNQLQQTLM EVDGR>	1668,81 MSO→ 1684,81	1684,77	E3
12	425-445	<FRFEISNAQGSISDVSSTLER>	2343,16	2343,20	E3
13	427-445	<FEISNAQGSISDVSSTLER>	2039,99	2040,03	E3
14	448-452	<IELQR>	658,39	658,36	E3
15	453-464	<QLVAFQELLDVK>	1402,79	1402,70	E3

- **Lfl-K γ 2 – Proteinfleck E3**

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse(n)	Fleck-Nr.
1	73-116	<GYGAGGGGGAAGLGFGLAQFGG GGGGGGGGGGGFGSSASFQVGR>	3549,63	3549,74	E3
2	117-134	<SMASGGLHGAAAFFGGGR>	1574,75 MSO→ 1590,74	1590,69	E3
3	135-142	<SLPPLVTR>	882,54	882,57	E3
4	166-178	<LQENVQLEAHLK>	1550,82	1550,75	E3
5	179-201	<SLTGGVSVAPVDTS ELAGDPTAR>	2200,11	2200,12	E3
6	207-227	<AEFDALVLANVQLEIELDNLR>	2385,27	2385,35	E3
7	228-236	<AFAQEMKAK>	1023,53 MSO→ 1039,52	1039,50	E3
8	257-271	<DLDGATELKVELESR>	1674,85	1674,84	E3
9	284-292	<RAQAEELLK>	1057,60	1057,46	E3
10	356-372	<ASSETESATSEITEVQR>	1824,85	1824,86	E3
11	388-401	<NGQLHNMLAEVEGR>	1567,77 MSO→ 1583,76	1583,69	E3
12	402-412	<YRFEINTMQSR>	1444,70 MSO→ 1460,69	1460,60	E3
13	425-429	<IELQR>	658,39	658,36	E3
14	430-441	<QLVAFQQLLDIK>	1415,83	1415,71	E3

7.4 Typ III-Proteine

- **Lfl-V – Proteinflecke H3, D3, S2, D4 und E9**

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse(n)	Fleck-Nr.
1	13-24	<TFGPVASSSATR>	1180,59	1180,45 1180,54 1180,54 1180,60	H3 D3 D4 S2
2	30-55	<SSGYGGFGGGGAGFGGSIGGGGMIR>	2176,98 MSO→ 2192,97	2193,07 2192,99 2193,00 2193,16 2193,08	H3 D3 D4 S2 E9
3	59-73	<SVGLGSSAQSGYGGR>	1382,66	1382,59 1382,60	H3 D3

				1382,59 1382,68 1382,66	D4 S2 E9
4	82-101	<ALSGQNVDFSLADALNADYR>	2140,03	2140,11 2140,22 2140,10	H3 S2 E9
5	105-117	<TNEKVELQELNDR>	1587,80	1587,84 1587,78	S2 E9
6	109-117	<VELQELNDR>	1115,56	1115,46 1115,53 1115,55 1115,56 1115,58	H3 D3 D4 S2 E9
7	118-126	<FASYIDKVR>	1098,59	1098,59	S2
8	144-149	<GREPTR>	715,38	715,38	D3
9	146-159	<EPTRVDGIYDQELR>	1690,84	1690,89	S2
10	150-159	<VDGIYDQELR>	1207,59	1207,47 1207,54 1207,55 1207,59 1207,57	H3 D3 D4 S2 E9
11	180-188	<ANLLDDLQR>	1057,56	1057,45 1057,52 1057,58	H3 D3 D4
12	193-200	<LQEELGGR>	901,47	901,39 901,47	H3 D3
13	193-205	<LQEELGGREEAEK>	1487,73	1487,76 1487,71	S2 E9
14	206-211	<NLRAFR>	776,45	776,43	D4
15	212-221	<QDVDDATLAR>	1103,53	1103,49	D3
16	227-239	<KVESLLEEIAFLK>	1518,87	1518,80	H3
17	228-240	<VESLLEEIAFLK>	1518,87	1518,80	H3
18	228-239	<VESLLEEIAFLK>	1390,78	1390,68 1390,68 1390,66	H3 D3 D4
19	240-247	<KIHDEELR>	1039,55	1039,44 1039,56	H3 S2
20	241-247	<IHDEELR>	911,45	911,38 911,45 911,46 911,47 911,43	H3 D3 D4 S2 E9
21	302-311	<FADMSEAASR>	1084,47 MSO→ 1100,46	1100,33	H3
22	318-327	<AAKQELNDYR>	1207,60	1207,47 1207,54 1207,55	H3 D3 D4
23	321-327	<QELNDYR>	937,43	937,39 937,45	H3 D4
24	321-328	<QELNDYRR>	1093,54	1093,53	S2
25	342-349	<GGNESLER>	861,40	861,36	D3
26	358-371	<FGLEAAGYQDTIAR>	1511,74	1511,70 1511,69 1511,69 1511,79 1511,74	H3 D3 D4 S2 E9
27	372-377	<LEDDIR>	760,38	760,41 760,41 760,36	D3 D4 S2
28	372-380	<LEDDIRNLK>	1115,60	1115,46 1115,53 1115,55 1115,56 1115,58	H3 D3 D4 S2 E9
29	378-385	<NLKDEMTR>	1006,49 MSO→ 1022,49	1022,35	H3

30	381-388	<DEMTRHLR>	1057,52	1057,45 1057,52 1057,58 1057,57 1057,55	H3 D3 D4 S2 E9
31	386-397	<HLREYQELLNVK>	1541,84	1541,77	H3
32	389-397	<EYQELLNVK>	1135,59	1135,43	H3
33	398-408	<MALDIEIATYR>	1295,66	1295,56	H3
34	398-408	<MALDIEIATYR>	1295,66 MSO→ 1311,66	1311,55 1311,58 1311,55 1311,64 1311,60	H3 D3 D4 S2 E9
35	409-417	<KLEGEETR>	1074,57	1074,53	D3
36	410-417	<LLEGEETR>	946,48	946,36 946,47 946,48 946,48 946,45	H3 D3 D4 S2 E9
37	418-433	<IALPVQQFSSTSYNFR>	1857,94	1857,99 1857,93 1858,08	H3 D3 S2
38	434-441	<ESSPSIDR>	890,42	890,42	D3

• Lfl-D (Fragment)– Proteinflecke H1, H2 und K1

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Gemessene Masse(n)	Fleck-Nr.
1	20-26*	<SLESQNR>	833,41	833,42	K1
2	43-52*	<VADVVEEIR>	1222,59	1222,55 1222,44 1222,55	H1 H2 K1
3	56-65*	<LQVDQLASER>	1158,61	1158,58 1158,48 1158,57	H1 H2 K1
4	105-114*	<QDVDDATLAR>	1103,53	1103,50	H1
5	120-132*	<RIESLNEEIAFLK>	1561,86	1561,83 1562,00 1561,79	H1 H2 K1
6	121-132*	<IESLNEEIAFLK>	1405,76	1405,69 1405,59 1405,65	H1 H2 K1
7	134-140*	<AHDEEVR>	855,40	855,40	K1
8	141-167*	<ELQAMMQEQVTEVDTVKPDLAALR>	3013,53 2 × MSO→ 3045,523	3045,63	K1
n.b.	190-203*	<SKLADVTDAGRNK>	1475,78	1475,97	H2
9	192-201*	<LADVTDAGR>	1018,52	1018,49	K1
10	219-231*	<QIQSYTMEVDSLK>	1541,75 MSO→ 1557,75	1557,79	H1
11	232-239*	<SANESLLR>	889,47	889,43 889,49	H2 K1
12	248-267*	<FSVEASGYQEAGSLEEDIR>	2200,04	2200,06 2200,01 2200,05	H1 H2 K1
13	248-268*	<FSVEASGYQEAGSLEEDIRR>	2356,14	2356,19 2356,17	H1 K1
14	279-287*	<QYQDLLNVK>	1120,60	1120,51 1120,46	H1 K1
15	288-298*	<MALDVEIATYR>	1281,65 MSO→ 1297,65	1297,61 1297,52 1297,56	H1 H2 K1
16	300-307*	<LLEGEESR>	932,47	932,51 932,47	H1 K1

8. DNA-Sequenzen

DNA-Sequenzen von *Lampetra fluviatilis* (cDNA-Klone PCR-Klone (*p*-) und genomische Klone (*g*-)), die für IF-Proteine codierende DNA beinhalten. Nicht-codierende Bereiche (5'-UTR, 3'-UTR, Intronsequenzen) sind **grau** unterlegt, Sequenzen, die aus degenerierten PCR-Primern resultieren sind **rot** unterlegt. Der Poly-A-Schwanz, das Polyadenylierungssignal, sowie Codons, die für das erste Methionin bzw. ein Stop codieren sind **rot** dargestellt. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung des „sense“-Strangs im FASTA-Format angegeben.

8.1 Typ I-Keratine

>*lfl-k10*

```
GGCAGATCTCCTCCAGCATAACCACCAGAATCATCATCAGCATCAGCAGCAGCAGCATCAGCATCATCAGCATCA
GAATCAGCATCAGAATCATCATCGACAATGTTTTCTTACGTTCCACAAGCAGTGTCAATCTGGGAGGCAATCGC
CGTAGCTACTCGGCAAGCATGCACGGTGGCGGGCGGTGGTGGTGGTTATGGTGGCGGTAGCATCTCGCGTGTGTCC
TACTCCAACGTGGGCAGTGGCTATGGAGGAGGCTTCGGTGGCGGGTTTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTACCGT
GGTGGCGGCTACGGTGGTGGTGGCGGGTTCGGTGGGTTCAACAACCTCAACGTGAGCGGTCACAGCGCGGGGAC
GAGAAGCTGGAGATGCAGGGACTCAACGATCGTCTGGCTGGGTACATCGAGAAGGTTAAATTCCTAGAGGGAGCT
AATCGCGAGCTTGAGCTGAAGATCAAGGAGATGCTCAAGGGCAAAGGAGGCTCCTCCAAGGACTACAGCGCCTAC
TACAAGATCATGGACGACCTGCGCGCAAAGATCCTGGCTCAGATCCTGGAGAATGCTCGAATCAGCCTGGAGATT
GACAACGCGAGGCTGGCAGCTGACGACTTCCGCACAAAAGTGGGAGACGGAGCTGGCTCTGCGCAGCTCGGTGGAG
GCGGACATCAACAACCTGCGCGGGCTGCTGGACGAGTACAACATGGCGCGCATGGGGCTCGAGGGCGAGATCGAG
AGCCTCCGCGAGGAGCTCCACTTCATGAGGAAGAACCACGAGGAGGAGTTGGCCGCTTGGCTGCCAGCTGGAG
GGTTCATCCATGTGCGTGGAGGTCGACAGTGCAAAGGGGTGGACCTCAACAAGATCCTGGCCGAGATCCGGGCT
CAGTACGAGGCGATGATCGCCAAGAACC GCGCCGATCAGGAGGAGGCTTCAAGAAGCAGGTGGAGACTGTGAAG
GTGTCCTCGGTGCAGCAGAGCCAGGCATCCAACCTCGGCCAAGAGCGAAGTGGTGGAGACGCGCCGCGCCATGCAG
TCGCTGCAGGCAGAGCTCGACTCCCTGCGAGGGCTGGTCCGCTCGCTGGACGACCAGCTGCAGGACACTGAGGAC
CGCAACGCTCGCGAGCTCTCCAGCTACACCATCATCATCCAGCGTCTCGAGGGGGACCTCAACAACATGAGGGGG
GACATCAACCGGCAGCTCAAGGACTACTCAGACCTCCTCAACATGAAGATGAAACTCGAGGCTGAGATCGCCACC
TACAGACGCCTGCTGGAAGGGGAGGATAGTCGCCTGGGCTCCATGTTCATCCAAGTCTTCGCTCGGAGTCGTGATC
AGCAGTGGTGGTGGTGGCGGGCGGGTGGTTTCATCTGGCGGTACAGCTATAGCAGCAGCAGCAGTAGCGGCGGT
GGCGGTGGTGGTGGTGCATCTGCAGGCTACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
TCCAAATCCTCCTCATCTGAGACCGTCACAAAGATAACAGACCAGGACCTCTTCCGCCAACAAAACCTGGCGTG
GCTGCAGTCCGTCAGGAGAGCAGCGAGAAGCGTAAGAAGCAGGTGATCATCACCCAGACCATCATCGATGGGCAG
GTCGTGCAAGAGAGCCAGGAGGTCCTCCGAGAAGACCTTCCAGCCTAGAGCGGAGACATCACAGCCCTGAACCA
CACCTCCATCACTACATCACTACATCACAGCCCTGAACCACACCTCAACCTCCATCACTACATCACTACATC
ACTCATTCACTCCATCACTACATCACTCATTACCTATCACTACATCACTCACTACATCACAGCCCTGAACCAC
ACCATCCATCACTACATCACTACATCACTCACTACATCACAGCCCTGAACCACACCATCCATCACTACATCACTA
CATCACTCACTACATCACAGCCCTGAACCACACCaTcCaTCACTACATCACTACATCACTCATTCACTCGCTCCA
TCACTACATCACTCACTCCATCACTCCATCACTTCTCCCCGCTCGCTCCCTGCTGCTGATGTTGTTGATGCTG
CTGATGTAGCTGATGCTGCTGATGTANCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGCAGCTGATGCAGCTGATGTAGCTG
ATGTAGCTGATGCTGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGCTGCTGATGCTGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATG
TAGCTGATGCTGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGCTG
CTGATGCTGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGCTGCTGATGTAGCTGATGCTGCTGATGTAGCTAATGCTGCTG
ATGTAGCTAATGTAGCTGATGCTCCTGATGTAGCTGATGCTGCTGATGTAGCTAATGTAGCTGATGTAGCTGATG
AAGCTGATGCTGCTGATGTAGCTGATGCTGCTGATGTAGCTGATGCTGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGCTG
CTGATGTAGCTGATGCTGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGCTGCTG
ATGTAGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGCTGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGTAGCTGATGCTGCTGCT
TCTGGTGTGGTGGCTCTGGTTTTGACTGGCCACTGTTTTAGTGGAAACTCTTTGGTGGTAACTGGTGCCATGGTG
ATGGGTGTCTCTGTCTTCCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGAATGATTGCGTGCAACAAGTCCAACGCTCTGTC
ACGAGCAATTACCGAATAAAATAAATGGCCACATGATTGAAACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Anmerkung: Der 3'-UTR dieses cDNA-Klons beinhaltet zwei Abschnitte mit repetitiven Elementen. Diese Bereiche, die unter C 2.1 näher beschrieben werden, sind **dunkelgrau** hervorgehoben.

>lfl-k11

GCTCACCCACCACACCTACACACTCACCTACCAAACCTCACTCACCCACCCCTCACCACCTACTCACCCACCCCT
 CACCACACCTGCCACTCCCTCACCGCAGACCCACCCATCCATCCCATGCGCACCCACCTCCTTTCTGCCCTCCG
 CGTCTATATAAACCGCTGCACCACCTCGTCAGCTTACAGCTTACAGCTCCAAGCTCCTGTACATCTCCCCCGTG
 TCTTTCTCTCCTCTCCTCGCTTGTCCATCCGCCTGTCTCTCTCCTCTCTCCTTTCGTGTGTCTCCATTCTCTC
 TCATCTCTCTCACAGCACCCCTCCACGATGCTTTCAGCTCCCGTTCCATCGGCGGCTACGGTGGCATGTCTAC
 GCGTCTGGGCCGAGGGTCCGCCAGCGTCTACGAAGGCGGCGGTTCTTCTGGGGGCTACCGCATCTCGCAATCCTC
 GATGGGTGGCGGAGGTGGCTATGGTGGTGGCTACGGTGGTGGTGGTGGTGGTACCOCGGTGGTGGTGGCTATGGAGG
 TGGCTGCGCCATCAGACTCCTCCTTCCAGAGCTTCGGTGCCTCCGAGGAGGTGGTGCAGGTGGCGGCGGGTTGAG
 CGGTGGGAATGAGAAGGCCGAGATGCAGGGACTCAACGATCGCTGGCTGAATACATCGAGAAGTGCATTCCT
 GGAGAATGCCAACAGGAACCTGGAGCTACGGATCAAGGAGTTGCTGAAGGGAAAGGGTCCCGGCAACAAAGACTA
 CAGCGCATACTACACCACCTGCAGGAGCTCAGGGACAAGATCCTGGCTCAGATCATGGAGAACGCCCGGGTCCAG
 CCTGGAGATTGACAACGCGCGGCTGGCAGCCGACGACTTCCGAGCAAGTGGGAGACGGAGCTGGCTCTGCGCAG
 CTCCGTGGAGGCGGACATCAACAACCTGCGCGGGCTGCTGGACGAGTACAGCATGGCGCGCATGGGGCTCGAGGG
 GGAGATCGAGAGCCTCCGCGAGGAGCTCATCTTCATGCGCAAGAACCACGAGGAGGAGCTGGCCGCTTGGCGGC
 GCAGCTGGAGGGGTCTATGTTCGGTGGAGGTGGACAGCACCAAGGGCAAGGACCTGCACAAGATCCTGGCCGA
 AGTCCGGGCTCAGTACGAGGCGATGATCGCCAAGAACCCTGTGGACCAGGAGGAGGCTTCAACAAACAGGCCCA
 GTCGGTGCAGGTGGTGGCCGTGCAGCACTCACAGGCGTCCAGGCTGCCAAGGTGGAGGTACGGAGACACGGCG
 CGCCATGCAGAGCCTCCAGGCTGAGCTCGATTCTCTACGAGGCTGATCCGCTCGCTGGAGGACCAGCTCCAGGA
 CACAGAGGAGCGCAACGCTCGCGACCTCTCCACCTACACGATGCAGATCCAGCGCTGGAGGGCGAGCTCTCGAA
 CCTGCGCCACGGCATCAACCAGCAGTTGAAGGAGTACGCGGACCTCCTCAACATGAAGATGAAGCTCGAGGCGGA
 GATTGCCACCTACAGACGCTGCTGGAGGGGGAGGATAGCCGGATGGGCAACATCTCTGCCAATCGACCTCTGG
 GTTGATCACCGTGAGCGGCGGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGAGTCTCCGGCGGTGGTGGTGGCGGTGGCATGAG
 CATGACCATGACCAGCAGCAGCAGCAGCGGCGGCGGCGGCGGTTAGCAGCAGCAGCGGTGGTGGATCGGTGGTGA
 GACCACGACCACCAAGGAGTCTGTCAGCTACTCCACCGCTACCGCTCTTGAATGCCAAAAGCTGCTCCTGTGCA
 GCTCGAGAGCTCGAGACGAGCTGCTGCCAGCTCGTGGAAAGCCACGTTGGCTCGAATGGAAGCCCTGACGTCA
 CAAAGGCCATGGCGTCT
 CT
 CT
 CCCCCT
 GTCTCTTTCT
 GTCTCCCTCACGCCCCATGTCTCCCTCATGCCCCCTGTGTCTCCCTCATGACCCCGTGTCTCCCTCCCGGTG
 CTCCACCGTGGGATTGAGAGAGTGGCCATAAAAAGCTCCTTTCAACCCAAAAAAGCTCCTTTCAACCCAAAAA

>lfl-k18

CTCATATCGGCCTCCTGAACAGCATCATCATCATCAGCAGCATCATCATCATCAGCAGCAACATCATCATCATCA
 GCACCTCAGCTCATCTCGCATCGTTGTAGCTTTTCGTTTGCAAAGCACCACCACCAACCACCACAACCACCACC
 CACAACCACCACCACCAACCACCACCAACAACCACCACCACCACCCAAAGCGATGCTCGACGAAGCTACTCATC
 AGCCAGCGCCTACGGCGGCGGCAGCGTCTCGCGCATCTCCTACTCTAACGTCCGGTAGCGGATATGGGGGCGGCGG
 ATTTGGGGGGGCCAGTGGCGGAGGGTTCCGGGGGGGCTCCTCCTCGGTGGGGTTAGCAACTTCAACGTGAGCGG
 TCTCAGCGGCGGGGACGAGAAGCTGGAGATGCAGGGACTCAACGATCGTCTGGCTGGGTACATCGAGAAGGTGCG
 TTTCTCGAGGGAGCAAACCAGGAGCTGGAGTTGAAGATCAAGGAGCTGCTCAAGGGCAAGGGAGGCTCCTCCAA
 GGACTACAGCGCCTACTACCCCATCATCGAGGACCTGCGCGCAAAGATCCTGGCTCAGATCCTGGAGAATGCTCG
 AATCAGCCTGGAGATTGACAACGCGAGGCTGGCAGCTGACGACTTCCGAGCAAGTGGGAGACGGAGCTGGCTCT
 GCGCAGCTCGGTGGAGGCGGACATCAACAACCTGCGCGGGCTGCTGGACGAGTACAACATGGCGCGCATGGGGCT
 CGAGGGCGAGATCGAGAGCCTCCGCGAGGAACCTCCTCTTCTCAAGAAGAACCACGAGGAGGAGCTGGCTGCCCT
 GAGGGCCCAGCTGGAGGGCTCCTCCATGTCTGTGGAGGTGACAGCGCCAAGGGCAAGGACCTCAGCAAGATCCT
 GGCGGAGATCCGAGCTCAGTACGAGGCGATGATTGCCAGGAACCAGCTCGATCAGGAGGAGGCTTCAAGAAGCA
 GGTGGACACGGTGAAGGTGGCTCCTGTTCAACAGAACCAGGCGAGCCAGTCCGGCAAGAGCGAGGTGGTGGAGAC
 TCGTCTGCTCCATGCAGTCACTCCAGGCTGAGCTGGACTCCCTGCGAGGGCTGATCCGCTCGCTGGAGCAGCAGCT
 GCAAGACACGGAGGACCGCAACGCTCGCGAGCTCTCCGGCTACACCAGCGTATCCATCGCTCAGGGGGAGCT
 CAACAACCTCCGAGGCGAGATCAACCGGCGAGCTCAAGGACTACTCGGACCTCCTCAACATGAAGATGAACTCGA
 GGAGGAGATCGCCACCTACAGACGCTGCTGGAAAGGGAGGATAGTTCGACTGAACATCAGCCAGAGCTCCAGCGG
 AGGGGTCAAATGTAAATCGGTGGTAGAAAAAAGAACCCCGCTGGAGCTCCACGCGGCTCGGGGAAGAACGA
 AGGTGATGAAACCAAGAGGGAGGGAGGGATTTCTCAGCATGGCCTCTGTACCCACCCGATCAACCCCAACCC
 CGCACGCCACAACCCACTCGCCCAGCGCCCAACACGAGCGTGCAGCATCTGCGTGTGTGCTAGATGCTGGTATGA
 ATTGAACTCTTTTTTATATTTACCAGGTAAGCCCCCCCCCTCCACCACCACCACCACCACCACCACCCTG
 AGCTGGGTAGCTCTTTATTAAGAAGCAACATGGCTGCCGCAAAAATGATAGCGCCACGAATTTGGGACTTGTCAAC
 GTCGGGCGGAAATTCAAAGTGCGCCGAATGCCGTGCAGCGCTATCGCTTCCGAATGTGTAAGAGGCGGGGGGG


```

GGGGGGTGGTGGAAACCGGAGGGGGCTTGCAGAAAATCCACGCGGACCCACTGGCAGAGAGAGAGACGCAAAC
GCAAACGTAACAACTAACACGCATCGGCCTAACGCAGCTCCATCGGACGAACGTTAACCACTTCTTGGTTCTTT
CGGTAAAGTCGTCGTTTGGTGTACCTTAGAGTCGCGGCATCTCTTCAGAAAAGATGAGAGACTCGATTAGCTGAG
CCTTCTTATCACGGAGCTTTGTTGAAGGATCTCGAAGTTATGTGGAATCCCTCCCCGTAGAGGCGGTNGACGACT
TTACCGAAAGAACCAAGAAGATGAATCCCTGCTGCAGTCACGAAAGCTTTAAATCGAAATTCATTCGCTTTAGA
CCGGAACTCTCTCCTCGGAGCTCCACCGTCCGTCCGTCCATCCCGGCGGAAAGATTTTGGGGAGGTGGTGTGG
GTTTTTTTGGGGGGGAGAGATAACGAGAGCCTAGTTCAGGCTTTTTGGGCGGGGTGAGGTTTTTTGGTTCGTGG
TTTGTGGGTGCAGAGGAAATGTCCACGTTTCCCTTCTCTATATCACTGGGGGGGTGGGGTGAGGGTTGTTTTGTT
AATAAGCACCTATCACCTCCTTTCCCCAACCTCCTTTCACATAAAACGGAACCTGCAAGTAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

8.2 Typ II-Keratine

>*lfl-k1*

```

GTCTGATCGCTGCCGACACCGGCACCCTTTCTCCCTGCACACTCGGGACACGCATCCCACTCTGCACCGCCAA
CATGTCTTACAGCATCAAGTCCAGTGGTGTGTCCAGCGTGAGCCGAGCCGAGTTCCTGGCGGAAGCTCCATCAG
GATTGGTGGTGGCGGCGGGTGGAAAGGTTCAGCAGCCATTCCCAAGGCTTCGGCGGCGGCGGTGG
AAGTCGCTCCCGCAGCAGCTACAAGTCCGGCGGCAGCAGCTATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
CTCGGCGTCTTTCTCATCCCAGGTGGCAGCGGGGCCCCCGCCAGAGATCGACCGCAGCATTCCTGCCCGTGCGCAA
CCAGGAGAAGGACCAGATCAAGGGTCTGAACGACCGCTTCGCCAACTTCATCGATAAGGTGCGCTTCTCGGAGCA
GCAGAACAAGGTGCTGGAGGCTCAGTGGAGGGCCCTGCAGGAGCGTGGCAGCGGCGGCTCCAACCTGGACTCGCT
TTTCAAGCCTACATCAACGGGCTCAAGCAGCACCTGGATGGGCTCGGCAACGAGAAGCAGCGCCTTCAGGTCGA
GCTGCAGCACATGCAGGGCGCTGTCAAGACTCAAGGCAAGTACGAGGAAGAAATTAACACCCGCACCCAGAG
AGAAAACGAGTTCGTGGTTCGTCGAAGAACTCAAGGCAAGTACGAGGAAGAAATTAACACCCGCACCCAGAG
GGATGGCCTCAACGACGAAATCGAGTTCCTCAAGAAGATCTTCGCCGAGGAGCTGCGCAGTGGAGTCAAGAT
CAAGGACACGTCACGTTCGTGAGCGTGACACCAGCCGCAACCTGGACGTGGATGGTCTCATCGCTGATGTGCG
TGCCAGTATGAGGCCATGGCCAGGAAGAGCCAGGCAGAAAGTACGATTTCTACAAGAAGAAGATCACAGAACT
CAGCTCCTCCGCTGGAAAGGGAGACGATGACGTTTCGCAACAGCAGGAACGAGATCAACGAACTGAACCGCCAGAT
GCAGCGCATCAAGGCAGAGATCGAGGCTCTGAAGAAACAGCGCGCCAGCTGGAGGCAGCCATCTCGGAGGCGGA
GGGCCGCGGGGAGATGTCCATCAAGGAGGCGAAGGAGACCATCGCCCGCTGGAGGAGGAGCTGCACAAGGCCAA
GCAGCAGATGGCGCAGCACGTGCGCGAGTACCAGGAGCTCATGAACGTCAAGCTGGCTCTGGACATCGAGATCGC
CACCTACCGCAAGCTGCTGGAGGGAGAGGAGTCCAGGCTGAATGCCGTTGCGTCCGGCATTGCCAACCTTGCCGG
GGCCATGAGCGGAGGCGGCGGCGGTGGCCACGGCTTCTCAAGCGGTGGTGGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCA
CGGCTTCTCAAGCGGTGGTGGTGGCGGCGGCGGCGGCTCAGGATTCAGCTACGAGTCTCCAGTATGAGCAGCAA
GAGGAGCTACTAAGAGCAGACTCAACAAGAACATCAACAACGAAAGTGTCCGTACCAGCCAATGCTCCCCAAGT
ACACCGGTGGTGCCTGTGCTCGTTTTTACAAAAGGTGCTTGCATGGGTATTAGTGGCCGTCGGAAGGCATAACA
TTTTTACTGCATGTGTATCCTTAAGTGACAGTAAAGAAAATGGGTGGCGGGTGTGAGACTTGGAAAGGGCGTC
GTAATTGGGTCCACAAATTTGCTGGTCTTGCCGCTGTAGGGAAAAGCTTTGTACGTTTTCTAATAAGCCTGATGT
TCTTCCGATCTTTTACGCTGTTGGCCACTATCTTGCATGCACCCTTTTAAATAGAAAGATAAAAGAAACACTCC
TGGTACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

>*lfl-k2*

```

GTTACGCCGCGCAGCACGGCGCTCGGCGGCTCGTACCGGGCCGGCTCGGCAGCGTCCAGCTTCGGCTACGG
CAGCTACGGCAGCGGCGGCTACGGGGTGGAGTGGGGCGGCGGTGTGCGCCGCGGCGATGGCCTGCGCGGCCCC
CGTGACATCGACCGCTCGGTGCTGCCACGCGCACCCAGGAGAAGGAGGCCATCAAGCACCTCAACGACCGCTT
CGCCAACTTCATCGACAAGGTGCGCTTCTGGAGCAGCAGAACAAGGTGCTGGAGGCGCAGTGGTACGCGCTGCA
GGAGAAGACCACGACCGGCTCCAGCGTGCAGAGATGTTTCAGGCTACATCAACGGGCTCCGTGCGCAGCTCGA
CGGCTGGGCCACGACAAGGGCCAGCTGAACGAAACCTGGGCCAGATGCAGGCCGTGCTGGAGGACTTCAGGGC
CAAATACGAGACAGAGATCAACAACCGCAACGCGGCCGAGGGCGAGTTCGTGGTCTCAAGAAGGATGTTGACGG
GGCGTACCTTCCAAGGTGGAGCTTGAGACTCGCCTACAAGGCTCGTGGACGAAATCAACTTCTGAGGAGTAT
CTTACCCAGGAGCTCAGCGAGCTGGAGGCCAGATCAAGCACACCAACGTGCTGGTGGAGATCGACAACAGCCG
CAACCTGGACATTGACGGCATCATCGCCGACGTGCGTCACCAGTACGAGACCATCGCGGCGGAGCCGGGCCGA
GGCGGACGCTTCTACCAGGACAAGTTCCAGAGCCTGCACTCGGACAGCGGGAGGAACGACGAGGAGCTGCGCAT
GACCAAGACCAGATCACCGAGCTCAACCGCCAGATGCAGCGCTTCCGCGCCGAGATGGAGGCCCTCAAGAAGCA
GCGCGCAAGCTGGAGTGGCCATCGCCGAGGCGGAGGGACGCGGAGAGGCCGACATCCGGGAGGCGAAGGCGGC
TATCGCTCAACTGGAGGAGGAGATCCACAAGGCCAAGCAGGAGATGGCGGCGCACGTACGCGAGTACCAGGAGCT
CATGAACGTCAAGCTGGCTCTGGACATCGAGATCGTACCTACCGCAAGCTGCTGGAGGGAGAGGAGTCCAGGCT

```

GAACGTGATCACCCAGCACATCACGCAGAGCGGGGGCAGCTCCACAGCCAGGGAGGTTTCGTCCCTTCGGGGGCGA
 CATGATGTGCTCCCTCGGCGGAGGTGGAAGCCACAGCGGAAGCGTAAGCTACAGCGGAGGCGGAAGTTACAGCCA
 GATGAGCTCCGGCGGATCCATCAAGATGTCAACACACTACTAAAGCCTGCACGGTTGCCAAGGAGATCCCAGAGG
 GCAGTCGCGAAGAAGGACCGCATACGTGCACTTTGCTCCCCCACACATCACGGGCACTCGAACATGTTTCATGAC
 AGTGCTGCTTACGCTTCTATTTGCTAAGAGAAGTTACACTTTGCTCCAATGCCACGCGGGAGCTTTGTGAAACAA
 TGCTAGAGAGTGGAAACGTCGTAGAGACTATTCTTCATCAGATTAAGTTGATGTCATCCCCCACCCCCACCA
 CCATCTCCCCATCTTTTCGCTGGGGGAATTAAGAGTGAAGATATGACACGGGTAAGTATTAACACCGCGAG
 TAGTTATCTGAACAGCAAAGTTGTGTCTGTGGCCAGACATCCCACCGTTTACAGCTTGTCTTACTACCTTGC
 CAATGCTAGAAATGCTAAATGCCATCCATTTCTTGTCAAACATTTTCTACTTTTTTTTCATGGCTTGTCTAAC
 CATGCACAATCATGGATTATT**AAAAAAAAATCTTTGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**

Anmerkung: mehrere für Lfl-K2 codierende cDNA-Klone aus verschiedenen cDNA-Banken haben kein echtes Polyadenylierungssignal, sondern nur eine A-reiche Sequenz 10 bp vor dem Poly-A-Schwanz (fett hervorgehoben).

>lfl-k3

GGCGTTTCTCGCTGAGCCACCCACACACTCAACTCTCACACTCCACTCTGCTCACTCACCTCTCTCTATTCCCAT
 TCAGAACCACCCGCCAGATCAATCCACCACCACCACCACCACCTCCTCCTCCTTGCAGCGCACGCTCAACAAG
 CGGTCCCGAATTTAATCGCACCCAGCCAAACACCTAAATTGACCGATGGCTTCCACGAGGTCCACCACAGTGC
 AGCAGCTCCACCAGGATCAGCGTAGGCGGCAGCGGGGTTTCGCGAGGCTTTAGCAGCGCTCGCTGTCCGCCGG
 GGCCGCTCGGGAGGGCGCAAGAGCGGCCTCTCGTCCGCCAGCTACAGGAGCGGGCGGGCGGTTTCGGTGGCTTC
 TCGGCTCATCGGCAGCGATGCTGAGCGGGCCCGCCCCGGAGATTGACCGCAGCGTCTTCCCGTGCACACCCAG
 GAGAAGGATCAGATCAAGGGCCTCAACGACCCGCTTCGCGAACCTTCATCGACAAGGTGCGCTTCTTGAGCAGCAG
 AACAAGTTCTGGAGGCGCAGTGGAGGGCTCTGCACGAGCGCGGGACGGTGGTGAGCGCCTGGACGGGCTCTTC
 GATGCCTACACCAGGGCCTCAAGCAGCAGCTGGAAAGCCTGTCCAACAACAAGCTGGGCCTGCAGAACGAGCTG
 CAGGCCATGCAAGGACACGTGGAGGACTTCAAGACCAAGTACGAGGAGGAAATCAACACTCGCACTGAGCGGGAG
 AACGAGTTCTGGTTCGTCAAGAAGGATGTGGACGACGATTTCTCAACAAGGTGGAGCTGGAGGCGAAGCTGGAG
 GCTCTGCAGGACGAGATCGAATTCCTCAAGAAGATCTTACAGAGGAGCTGCGCCAGCTGGAGTGCAGATCCAG
 GACACGATCCTGACGGTGGAGATCGACACGAGCCGAACCTGGACGTGGATGGCCTCATGCGGACGTGCGCGCC
 CAGTACGAGGCCATCGCCGCAAGAGCAAGGCCGAGTCCGACGCCTTCTACAGGAGCAAGTTTGCCGACCTGAAC
 GCGATGTCCGGCAAGGGCGACGACGACCTCCGCCAGAGCAGGAGCGAGATCGCAGACATCAACCGCAGGTCCAG
 CGCATCAAGGCCGAGATCGAGGCCCTCAAGAAGCAGCGCGCCAGCTGGAGGCGCCATCGCCGAGGCGGAGGGC
 CGCGGGGAGCTTGCCATCAAGGAGGCCAAGGAGAGCATCGCCCGCTGGAGGAAGAGCTGCACCAGGCCAAGCAG
 GACATGGCCAAGCAGTGCACGAGTACCAGGAGCTCATGAACGTCAAGCTGGCTCTGGACATCGAGATCGCCACC
 TACCGCAAGCTGCTGGAGGGAGAGGAGTCCAGGCTGCAGAATGTGACTGCTGGGATGGCCAACCTGGGTGGCATG
 GGAGGATATGGAGGCTACAGTGTCTCAACTTCCACGAGACGTCCAGCAAGAGAAGCTACTAAATGCAGAGCCGCT
 CCCAACATCGCTCAACCCACCCGAGGGCCAGCAGTGCATTTGTGGCCCGCAGCCAGGGCGGCTCGGTTCCGGC
 AGTGTGCATTCTAACGACGCGCTCACGTCCCCTTTTCCACGTGTCACTCGAAACCGCGTTGGGTTCAGTGGTTCC
 CTACCTGGACCGACGCTGGTTCGCAAAAGACTGTCCACGGAAGTCCCGCAGGTAGAAATGATCCGGTGTGTTGCG
 GCTGCGTTGGCAGTGGTGCACGAGCAGTAAACGAGCAGCAGCAGCAGCTCAATGCATTCGTCAATAACACC
 ACCGTGGCCTTAAAAATAAATATATGATAGGCGACGCTTCGGATAATGGCTATTATTGTGCCCTGAAGGGCCGTT
 GCCCCAAACGTCGCTAATTATATATATTTTTTTTGGTTGAGTTTTTTTTTTTTTGTGGCAGATACAATTTTTGAGTCCC
 TTTGAATAAAAAACAGAACAGGTGTGGAACCACTGCGTTAGACGAAGTAGTTTTTTTGTGTTGCCGTGTCTGAAACG
 TAGAAGTTGCTTTTTTTTCTAAATTGTTTTTGGCGCTCAATAGAATGTGCACTGGCGACCCGCGGCTTCCCTCT
 CCCTCTGGCTGGGTGGTGTGATTTCGCAAATTGGCTCAAAAAAGTGAATCGGCGCTTGAGTATGTGGGGCTCTTCG
 GAGGTGGGTGGAAGTTCGCTTTGGTTTTGGACACTGGCATCTGTAGGTGCTTTTAGTCCCGATTTAAAGGAAAGA
 AAGAAAATAAATACGGTGGTGTGCGCGGTGGGGGGGAGGGGTTTGTGGGCGAGCCTTTTAGTAATAGCCAGAAT
 GATGCAATGGCCGGTATAGCTGTCAAAGTGGTTCGATTTTTGTTGCGGGAGGTGCTGCTCACCCAGCCTGTGCT
 CCCGCGGGCGCACTTAGGGGGGGAGGGGATCTGACATATATAACGACTTGCTGAGCACCACACAGGAGCGCCCC
 GAGAGAGAGAAGGTACCGTCAGATCATCCGTGAGCTCGCGGTTGAACGCCATTATTGACCACTCCCGTCTAACGC
 AGCAAGCGTGAACGGGGCCCTTCGTGGCAACCGCACTGCGGGGGTCCGCTTGACCGTGCATCGCCCGCGCCGGT
 TCAATGTGGGTTGGCGAGGGCGCGGGGAGCGTAAAGTACGGTACAACAACGGAAAAAACCCCGCTTGCGACGCT
 CGACGATTATTCCGAAGCGCGGGGCGGCATACGGTGGCACTTCGCGCGTGCAGGGGGTGGGCGGGGTGTCGGTGA
 GGTACGTTGACAGCTAAGCGGTCCGCGAATGCATTGCGAGTGGGCTGATTGGACGCACTGGAGCAGCAGCAGC
 AGCAGGAGCAGCGGATGTACAGGTGGCTTTGGTTCAGTGGCCACGATTTGTCGTCATGGCAGGGGTTAACCTCTC
 TTATACGTACTCACGTGTACCG**AAATAATAAAAGCAGCTTCGTGAATTCACCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**
A

>*lfl-k8*

```

CAAGCCACCACGCTCCCCTCCCACCGCGCATCACCGCACATCCCACGAGAGAGAGAGAGGAGACAGACTTTTTGGAA
CGCAGTTTCGCTCAGAGGTCCTAAACCACGCGCGGCTCACCGCTGCCACGTTACAGCTCCGGGTGTAGGGGAAGAC
TCCATCGTAAAAAGGGTTGATATTTGTAGAAAACGCAGGAAGCCACCAGCAGCGAGATGTCCTCCGCAACCGTG
GCTTTAGCAGCAAGTCGGTGGTGACCGGGGGTAGTCTGAAAGGCGCTCGCTCGTCCATTTCGTTACGATGGCCGTG
CATCCCCTCGTCCGCGGGGGTCTGTTCACGGGAGCCCCCTCCCGAGATCGATCGCTCTGTGCAGGACGTGA
GGAGCCAGGAGAAGGATCAGATCAGGGGCTCAACGACCGCTTCGCCAACTTTATCGACAAGGTTTCGCTCCCTGG
AGCAGCAGCGCTCGGTGCTGGAGGCTCAGTGAAGGTGCTGCAGGCGAAGGGCGATGACAAGTCGAACCTGGAGG
ACATCTACCAGGATACATCCGCGGCCCTCAGGCGCCAGCTCGAGGTGCTGCAGGAGAACAAGGAGCACCTGCAGT
CGACGTGGGGCACATGCAGGGCGTGGTGGAGGAGTTCAAGAACAAGTACGAGACGGAGCTGAACAACCGCAATC
ACGCTGAGAACGAGTTCGTCCTCATCAAGAAGGATTTTCGACGACGCCACCTCAACAAGGTGGAGCTGGAAGCTC
GGCTGGAGGGGCTGACCGACGAGATCGACTTCTGCGGAGGATCTACGAAGAGGAGCTGCGCGAGCTGCATGCCG
AGATGAACAACATCTCGCTGACGGTGGAGGTCGACACGAACCGCCACTTCAACATGGACGACATCGTGGCGAGCG
TCCGCTCCCAGTACGAGGCCTTGGCCAGCAGAGCCGGCAAGAGGCCGAGGACTTCTACAAGGTCAAGTTTGAGG
ACATCAACGCGTCCGCAGACAAATCCAACGAGGACATCCGCAACTCCAAGCAGGAGCTGAACGATTTGTTGCGAA
CCATCAAGAGCCTCACGAGCGAGGTCCAGAGGCTGAAGCAACAGCGGGCAAGCGGAGCGCGCAGTGGCCGAGG
GCGAAGATCTCGGCGAGCAGGCGGTGAAGGACGCCAAGCAGAGGATCGCCGACCTGGAGCAGGAGCTGGCCGACA
GCCGCCGCCAAATGGCGCAGCATGTGCGGACTACCAGGAGCTGATGAACGTGAAGCTGGCGCTCGACATCGAGA
TCGCGACCTACGGCAAGCTGCTGGAGGGCGAGGAGGCCGCTGTCGTCCTTGCCGGGGCCAGAGGGAGGAACC
CCAGGAACACAGCTACAGCTTTGGGGATGACGACCTGACTTCCCCTACGAGAGCGCCATCCCCAGGTCTGCCA
AGACGGTCATCATCAAGTCGATCGAGACGCAGGATGGCAGCGTCTTGTGCGGAGACGACCGAAGTCCGAAATTA
CCCCGGCATTGCGTTCCCCCGCTGCCAACCTGGCTCCAGCCCCCCCCCCCCACCGCTCCCCCGCTGTGCGATGTC
GCGATGCCATCCCTAGTGGGCACCTCCCAGCGGGAATGAAGCCGCTTGGCGGACCGGAGACGACGTGGATTG
GAATGCAAGAGTGCAGGTTCGATAGCTGGAAGGTTTTAAAAAAAAAAGAATACAAATATAACGTGTTGGAAAAAA
TATGCAGTGTGAAATATTTGGCTGTGGAGGGGGTGGGGTGTATTTGCTTTTGAAGTCCACTTTGTATCCTTTTCG
CCGATCTCTGCATTAGTCCCCTTTCTCCTCGGCCACTGACGCTGGCACAAAACCACGGTTTGATACGTATGGT
GCAAAGGAAGTTCAACATGCACACGTCTCTTTAAAGCGACCTCTTCATAGCACTCCCATGCATTCACCGCTCT
CGTAAAGCAGCAGCTCCGACGTTTCTCTGCGTGTGCCGGGTGAAGCTTTTTCAAGAACTTAACCTGTAAACGGCTG
AACCGAACAGTTCCTGAAGAAGCTGCCCTGCACGTGCAACAAAACGTCGGACATTGTACCGAACAAAGCAAA
AACACATCAACAAACACAGTAAAGAGCCACTTAACATTTGCTTTTGTCTTGACCAGTGCTGTGGCACTGCAACTT
GTTGACAATAAATTGTGGTACCGGTGCAGCATGTGTTAGGAAGTTTAAAAACTAAGTATCAACTCCACCGTGCA
CAGAAGACCATCAAAAGCAGACACGTGGTGAACGGTGGTTAGACGAACGTTCAAGTGCAGCCTCGCCGCTCAA
GGGCGCGCACGGTGGAACTCCGCTCTCGGATTCTGCAGCTCTTGAAACACAAACCTGGGAATAGAAAGGCGCTCG
CTTGCGCTTGTAGAGAGTGCTTTTGTCTTTTTTTTTTTAGTTTTGCTGGCGTGGGTCTGTGCGGCTGTTTCGAA
ACCGTTCCTACTCCGCTTGGGCTGGGGGGGGGGTGTCTGTGTGCGCTTTTACTATTCTGTAGTGCGTAAAGAATA
GACGCTTAAGTAGACGATCACTGACGGGAAGGTGAAGGGCCGCTATTATTCTCTAGAGTCTGCCGCGTGAGTATA
CGTGCCTGCGCACGATGGGATTCTCGGGAGATAAAGCCGGTGCAGTGTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

8.3 Keratinartige Proteine

- IF-Proteine des α -Typs

>*lfl-ka1*

```

GCTCTTGCTCCACCTGGCTCCATCACTTCCCCTCCATCCTCCGTCATCTTCTCCGGCTTCGATCTTCTCCTCC
TCCTCGTTCAACTGCACCAGCAGTGGCACCTCCGATCGTCCATCAGCAGCAGCACCACCAGCACCCTACCTCC
TTGACCTCTCTCCACCACCACTACCACCGCGATGTCGGAGGCGCGTTCCTCGCGACGGTGCAGTCCGTTGCGCTA
TGGAGCCCAGTACTCCGGCGCCGGCCTTGGCGGGGTGCTGTCCAACCTTGGCGGCGGGCTCCCGTTCTCCAA
GTTTTGGCGGCGTAGGTCTGGCGCGCGGGATGGGCGGCGGCTTCCGTGGAGGCCACTGTGGCGGTGGCGGTGGCTA
CGGCGGCGGTTGGCGGCTACGGCGGCGGTTGGCGGCTACGGCGGCTCCTCCTCTCGTTCGGCGGAGGAGCGGTGG
CGGTGGAGCGGGCGGCTTCGACGCCGGCGGTTCCGAGCGAGGGGGGGCGGTGCGTCCGCCGCTCTCCGGCTGCT
GTCCACCAACTTCAGGAACCGCGTCCGGCGCAACATCAACGTGGGCACGTACGGGGTCAACCCCTCGTTCTTGCA
GTCGACCTCGCACCGCTCACGTCCGTGCACTCCGGCTCGCTGGGCGCGGGGCCCGCATGGTGGAGGTGGACCC
GGCCTCGTTCCCTTCCATCGACTCGGTGCAGGGAACCAGAATCCGCGAGAAGCAGGAACCTCCAGGTCTCAACGA
CCGCTTCGCCGGGTTTCGTGGATAAGGTGCGCCACTTGGAGCAGCAGAATGCGATCCTGAAGGCGCAGATCTCCAT
GTACACCAACACGGAATCGGGCGGCACGGCCAACACTACGGTGTCTATCGGCTCCGTACGGGGGCCCTCAACTC
GCAGATCGATGGCCTGCGGCAGCTCAAGGCGGCACTCGAGGCCGAGATCGACTACTGGAAGGGCGTGTATCCAGGA
GTACACGGCCAAGTATGAAGAGGAGGCGGAGTCAAACAAGAGCCTGGAGAACGAGTGAACACCTTGAAGATGA

```

GGTGGACAAGACATAACCTCTCCATTGTGGAGCTGCAGACCAAGGTGCAGGGCGTGGAGGATCAGATTGACCTCAT
 GAAGAACTCTACAACGCGCGCTCAAGGAGGTGCAGTCAAGCTTTTCATGGGCGTTTCGACCAACGCCGCGTCTC
 CATCACGGTGGACAACATAACAGGCACTGGACCTCACCACGGCGCTCAACGAGGTCCGCGGGCACTACGAGGC
 TTTGGCCGCCAAGAGCAAGGAGGACGCCTTCTCATCCGTGCAGTCGCGGATCATAACAGGTGGTTCGGCGCCGTCCA
 GCCCGAAACCAGGTCTCGGCGAGGCTAAGCAGGAGCTGCGCTCGCTCAAGATGCAGATGGATGGCTGCGTCCG
 CGAGATCGACAAGATCCGGGAGGCGAACGCGGAGCTGGAGACACAGATCCAGGAGGCAGAGGCGAACGCCACGC
 GCAGCTGGAGCAGTGGCAGGACAAGCTGGCCGTGCTCAAACGTGAGCTCGACGACATCAAGAAGCAATCGCGCA
 CTACGCACAGGAATAACAGGAAGTCTGGCCAAACAAGATGGCGCTGGACATTCAGATCGCGGCCACAGGAACT
 CTTGGACAGTGGAGAGGCGAGGATCAGCAGCGGGGGCGGCATCACGATCTCCATGTCCAAGTCCACGACCATGTC
 TAGTGGTGGTGGCGGTGACGGTGGTGGATTTGGGCTGGGTCTCGGATTGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 CGGTGGTGGTGGCGGTGGTGGTGGCGGTAGCGGATTCGGGCTGGGTCTCGGATTGGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 TGGCGGTGGTGGATTACGCTCTGGCGGTGGTGGATTTGGCGGCGGTGGATTACGCTCTGGCGGCGGTGGATTAG
 CTCAGGCGGCGGTGGTGGAAAGTAGCTCCTTCGGAAATTACAGCAGCGGTGGAGGCAGCAGCAGCAGCATGAGCAC
 CAGTTTTGGAGGTGGACACGCGCTCTCGTCGACCCTCATGGGATGAGCGGCGAACGGATGTTGACCGCGAGCCGT
 CGTCCCCTTTGTTTTTACACGAACAAAGGAAAAACGTTTTCGGAGATCGATCGAATTAACGCAACGTGAAAAACC
 CAAACTCCAAACGCCACCCGAGTTTTCTTCGACAACGCAAAGCTCAAGGCTCCCTGCAGCATGTACATTAGC
 GAAATGTGTAATTCCTTTCCACTTGGGGCTAATATCCACATGCTTGGGTCCGATGTCCGGGGTTAGGGGGGACA
 TGTTTTACGCCGATCGTGGCAGGAGGGGGGGCACCTTACCCCCACACACACCACCGACGGTTCGCCCCACTA
 GACCAGTTTTGGAGCTCTTCGCCACCAAACTGAAAGGCAAAGAGCAATTAAGAGCTACAGTGAACGTCAAT
 AGCTGGTAAACAGTAGGAGGGGACAAGCAATTAGGGGGCAGAGGACGCTAGCCAATCAGACACTGGAAACTACCT
 TTAGCTCTATCCACACGAGCTAAGCAGTCAATCAGGGTCTAATGCTACTCCTATCCCAAACCTAACTCAGCTGC
 ACCACTGGCGCATGGGCCACCTCCCCTTCCTGTTACGTTTTCACTTCTGTGCGGTTCCTTGACACGGACTGACCG
 GTGCTCCGCGATTGTGAACGTGGTCTGTGGCAGAGTCGGCTGCTTGGCTGCGGTGGGGTTTTGGTGGTGGTGGT
 AGTCGGTTGGTTGACGCTAATAAACCTACACGCATTAACCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

> *lfl-ka2*

GCAGCTCGGAGGACCAGAGGCAGCTGCGAGCAAAGCCACCTCAGCCACTCACACGACTCCGACTCTTCCTCACCC
 TCCTCACCGACCGACTCCTCCGAACCCCCCTTCGTGTGCGAGACAACCGCAGACCGCAATGGCAGAAAAGATGCGT
 ATCCGGGGAGCTTCCGTGCGCTACGGCGGAAGCTACGGCGGGCAGCTGAGCAGCGTGTGGGCAGCGCGGTGTCC
 AGAGGGTTTGGAGCAGCGTCATCCTTCGGGATGGGCAGCAGCCTGGGACTGGGGGGCGCCTGGGATTGGGGGGC
 GGCCTGGGTCTGGGGGGCGGCCTGGGACTGGGGGGCGGCCTGGGATTGGGGGGCGGCCTGGGTCTGGGGGGCGGC
 TTGGGGGGCGCCTAGGGATGGCGCGGGCTCTCGGCGGAGGCTTCAGGGGGGCTGGTTTTGGGATCGGTGTGGGT
 CTCGGATTAGGCGGCGCTTCAGGGGGGGCCATGGCCGCCGGTTGAATCTTAGGGGGCTGGGGAGCCTCGGAGGT
 GGATACGGAGTCGGCTTGGCGGGGTGGGTGAGTGGGGGGTTTTGGCGGCCCGGAGCCGGTTTTCGTATCGCCT
 CGCCGGCACCTGGGTGGACGTGGGTTCATGGTTCGGGGGCTATGGCGTCAGCCCCGGTTCTGTACCCATCTGGC
 GCCGGGGGTCTGCCAAGCATGCCCTCCCTGCCACCATCGACGTGGCCAACCTGCCCTCGCTCGACTTCGTGCAG
 GCGTGGAGCTCAAGGAGAAGCTGGACATGCAGAGCTTGAACAACAAGTTCGCCACCTTCATTGACAAGGTGCGT
 CTGCTGGAGCAGCAGAACCGGATTCTGAAGGCGCAGATCTCCATGTTCTCAAACAACGACCCGAGCGGGCCAGT
 AGCCCCGCGGTGGTCATCAGCGCCGTGACGGCCAGCTACAACCTCACAGATCGAGTTCCTCAAGCAGACCAAGGCG
 GCCCTCACGGCTGAGATCCAGCACTACAACCTCCATCATCTCGGAGTACACCACCAAGTACACGGAAGAGGTTGAG
 ACGACGCGAGTTCGAGGTCGAATGGACCAACCTCAAGGAGGATATTGACTCGATCTACCTGGGCATCGTGGAC
 CTGCAGACCAAGGTACGGGCCTGGAGGATCAGATCACGCTCACCAGCAGCTTACACCGCGAAAACCTCGCGAG
 ATCCAGGCCCTGCTTGCCGGAGGCTCCACCACGGCCGTGTCCATCACGGTGGACAACCTCGGCGCAGGCGCTGGAC
 CTCACCAGGCGCTGCAGGAGGTCAAGTGCAGTACGACTTCTGGCGGGCAAGAGCAAGGAGGAGGCGTTTTGCG
 GCCGTGCAGCAGAAGATCACGGCGGTGAGCGGAGTGTCTCAATCGAGCGTGAAGTGTGACCCAGTTCGAGGGAG
 GAGCTGCGCACCTACAAGCTCCAGTTGGAGTCCATCACCCGCGAGATCGAGCGCATCCGTAGCGTGAACGTGAAG
 CTGGAGTGCAGGTGAAGGAGCTGGAGGTGAGCAGCACCACGGAGGTGGACCAGTGGCAGAGCAAGGTGACCGTG
 CTCAAACCCTCGCTCGACGAAGTCCGCAAGGACATCGCGCACTACGCACAAGAATACCAGGACCTCCTGGCCACC
 AAGATGTCCCTGGACATCGAAATCGCCGCTACAGGAAGCTTCTGGACAGCGAGGAGGCCAGGCTGAGCAGCGGC
 GCGGCATCACCGTCTGACCCGGGGAGGAGGAGGCGTTCGGAGGTTTTGGCGTGGTGCCGGCTGGGCTACGGT
 GGTGCCGGCTTGGGTCTGGTTCGGTTCGGGCTGGGTTACGGCGGCGGTGCCGGTCTGGGTACGGTGGCGGTGTC
 GGCTTGGGTCTGGGCTACGGTGGTTCGGGCTGGGTTACGGCGGTGCCGGCTGAGTTACGGCGCTGGCGGCTTG
 GGTCTGGGGGGATACGGGCTGGGCAGCGGGCTGGGCAGCGGGCTGGGCAGCGGGCTGGGACTCGGACTTGGCGGT
 GGCATCGGGCTGGCCGGCGGTTACGGGGCTTCCATGGGCAGCTTCTCGACGGCAAGAGGCTACGGGGGCGAGC
 AGCAGCTTGTACGGGGCACGGTCCCGCTTCTCCGCTCCTTTCGGGCTACGGGATGTGAGTCCATCGCTCAGCT
 CGCCTCTCCTCTCCACGACCCTGGTTCGAACTCACGCTTCCAATGTCTCCGGCTCCTGCCGGTTCGCTGCCAACTC
 CTGGCTGATTTCGGGCTCGGCTTAGCCTTAGATGATGACGGCGATGATCAACGATGACGACGATGATCAACGATG
 ATGATGATTTTCACTTCTATCGTGATTAGCACTGGAGGTAACCGGACCATAACCGCTACTCAACACAATGGGCCA
 CGCGGTTGGGATTTGCACGAGCAAAGTGTAAATTGATTACAATCTACCCCTCCCTCGCCCCCACTCCCC
 ACTGNCCCCCCCCAACCACACTCACTCACCACCACTACCAACCAGAAAGTTCAGTTCAATTCGCCCCACCCCA

ACGCCACGAGTTACTGAATCGATATTCGATCTGATTCTCTGCAGCTCACCACCACCACCTCATCATTTGTTGTCA
 CATGTCTAGCACCGTGGTGAAGATCATGATTATCTCCACCTTCATTGTCTTTGTTATATACACCACCACCACCATT
 ATCACCACAGCCATGTCTTCCATCACCTCCATTATCAATATGATCATCACGATGAGCATCATCACCACCTATCAT
 TGATTACCACACCTCCTCCCCTAACATCATCATCAGTATTCATCATCAACCACCACCTCTATGACCACCACCAAC
 GCCGTAATGGCAACCCTCCTCATCTCCCACTCACTTTCCCTCCAGGATCAACAGCGGTGGCGGCATCACCGTCTC
 CATGGCGTCCAGCACGAGCATGGTCCCTGGCTTGGGCTCGCTGGGCCACGGGGCCTACGGGATCCCTCTGGGGGG
 CGCGCCGGGGTCTTCCGGCGGGACTTTGGCACGAGCGGCCTGGGGGGCGGCTACAGCGGCCTAGGGGGTCCGGC
 CGGGGGCGTCTACTCGTGGGGGGTCTTGGAGGGGGTACAGCATGGCGAGCAAGAGCTTCAAGTCAGGCGCAGT
 GTGGAGTCTTATGGTCTAGGTGGTGGCTATGGTTTTGGTGGCGGCGGCGGCTGGCATCGGCGGTGGCATCGG
 CGGTGGCATCGGCGGTGGCATCGGCGGTGGCATCGGCGGCGGCTTCACTGGCAGAGCCATTGGCCTGGGAGTGG
 TTACGGT
 AGGAGGAGGAGGAGGCAgCAACTCAGTGAGTTCCAATGGTCTGCGTTTTGACGAGTCTCCCGTCTGTCGTTTTGA
 GCAGCGCGTTTTCCGATCGGGTTGTACGATATGGCGGCGATACAATGTATAGATATGGTGGTCTGTCTATGAA
 TATATTCNCTGCCACCATANGAACATGGAATTTCCGCCACTGGGCTCTAATTTGGGGAAAATAATCAGCCTCTCAAT
 GCTAATTTGAGCACGAAATCTCTTCTNACTTTGAATGATTNCNTGTGTGGTGGTAAANTAACCAAAAATCAACCGCA
 CACCCACCTGACCATGACNATCGAACACTGNNTAANCAATGCTAATGGGTCTCACACCACGTGACCCTGCTCGTN
 AANTACTGNCNCCCACANNCTCTC...NICHT SEQUENZIIERT...NNAGTCCNCCGGCAAGNAAG
 GGTNGGTTGGGTGGGGTAANGNANGCCNGCATTGCCAATCAATTNANGCCCANGCAAGTTTTTGGTTTGGNCGG
 ANNNAGGGGGTTAAACGGGCAGGGNNNGGGNNAGAGAAGAGATGAGTAATGTGGTACAGGAGGATGTGGAGCT
 AAGTGGACTTGCCGATGACGTACCAGCGGTGTCAAGATCAGCCTCTGCGGAGGAGGCTCGTGAAGGACTCTACTG
 TGCAGTTGGAGGCAGTCGCCCTCCAGCAACACGGAAGGTAGAGTGGCGACGCTCACAACAACGAGCGGAGGGCAG
 GCGGATAAAAATTCAGTATGTTGGCACAATAGGGGGTTAGCTGGTGCATTTATCAGTCATCCTAGCCAACCCAT
 GGCACCTGCTGGGTCTATCTCATAACCTGTGAGCGAGCCTCAAAGTGCACCTGGCCTGGCACAGGCGTCTGTGGTG
 ACGTCACAGCCACTTCGTGGCGAATCGCCGTTGTATTTGTTGGTTTTGATCTGAATGTGCTGTGATATTTAGTG
 TGTGTCTGACTCAAATAAGCTTCCACATTTCTGGAAGGCTTACCAGGTCATGTTGGTGTGGCCAGTACGACAC
 CCGACCCCTTTGTCTCCCCAGTGGCGATTTTGACACACCCGACAGGTACTATTGAGGCTGAGTCGACCTAGG
 GGCACACAATAACGGTTTTAGATAAACATCACTCATAAAAAGCTGCGAGTGGGAATCGAAATCTGTTGCGCCGATTT
 ATAGCCCAAAGCGCTAACCCACAGCCCCACCCTCCCCACACACAAGACAAAAGCCCCCGTATAGCCTTGGAGAGA
 CAAGTGGCGCTCGGGCACACGAGGGGGTTGGGTGGCCAGCACCACGCCCCAAAACAGACGCGCACACACTCACACG
 CGCACTCACTCACACGCGAACTCACTCACACGCGCACACACGCGCACTCACTCACACTCGCATTCACTCACACCG
 GCATTCACTCACACGCGCACTCACT

- IF-Proteine des γ -Typs

>*lfl-ky1*

CAAGTCTTCCGCGTCTCATCCTTAGCGTAATCTTCATCATCTTTATAGTTCTCATTGGCAGCGTGGGCTTATAG
 ATTGCGATGTCGACCAGCAAGGTACATTCGAGCTTCGTGGAGCATTCCACGTCCACGCCATTACGGCGTCCGCGT
 CTCAACTTGAGCCAGGGCCCCGCACGTACAGACCTACAGCACCGTTTTCCAGGCTGGGCGGCGTGCCTCGGGCGGA
 GGCGGAGGTGGCGGCGGGATGTGCGGCTCCTCCAGCAGCTTCGGTGGAGGGTTAGCTGTGGAGGTGGAGCGGCC
 CTGGGTGGTGGAGGAGGCTACGGCTACGGAGGTGGAGCAGCACTGGGCGGTGGAGGCTTTGGGGCTGGGCAGCTTG
 TCTCTGGGAGGAGGTGGCGGTGGCCTCGGGTTTGGAGGATACGGTTTGGGAGGAGGAGGAGGCGGCGGTGGGCTC
 GGGTTTGGAGGTGGCAACATCGGAAATAGCGCCTCGTTCCAGGTGGGACGCTCCGTGGTGTGCGGTGGGATGCGC
 GGCACCTGGGCTCCCTGGGAGGAGGGAGAGCCATAACCACCGATGATGACCCGAGAGACGGAGCGGCAGACTCTC
 CGCACACTCAACGAGAGGTTTCGCGACCTACATCAACAAGGTGCAGCAACTGCAGCAGAGAACCGATGTCTGGAG
 GCGCAGCTTCACTCGTGTACGGGCGGCGGCTCGTGCAGCCCGTGGACACGGAGCAGCCGGGGGACGCGCAGGCG
 CGGCTCGTGGAGCTGAGGGGCGTGATGGACGGGATGGTGTGGACAACGTGCGCCTGGAGATCGAGCTGGACAAC
 CTGCGCGCCTTCGCGCAGGAGGTTAAGGCCAAGTTTTGAGTTTGGAGTGGGCGTCAAGTACCAACTGGAGACGGAC
 ATCGGCCACATGCGCAAGGACCTGGACGGCGCCACCGAGCTGAAGGTTGAGTTGGAGTCCCGGTACAGCATGCTC
 ATGGAGGAGCTCGAGTTCTGAAGCGCTCGCAGGACGAGGAGCTGTACGCTTGGGTGCAAAGTCCGACAAGGTG
 GACTCCTCGGCCACGATCGAGGTGGATGACGCACGCTCCATCGACCTGGCCGGGATGTGGCGCAGATGCGGGAC
 GACTACGAGAGCATTGACGCGCGCAACCGCGAGGAGGCCGAAAATACTTCCGACCCAGGTGAGCCAGATCGAA
 GCGGAGCAAGTGGAGAAGAGCTCTGCCGTGGAGTGCACACACAGCGAGGTGTCCGTGGTGACCAAGAGCATGCAG
 GAGATGCAGATGGAGATGCAGGGGCTGATGTCCAAGCACAACCAGCTGCAGCAGACGTTGATGGAAGTGCACGGT
 CGCTTCCGATTCGAGATCTCAACGCACAGGGGTCAATCTCGGACGTAAGCAGCACCCCTGGAGCGGTCCGCGATC
 GAGCTGCAGCGCCAGCTGGTGGCCTTCCAGGAGCTGCTGGACGTGAAGACGCAGCTCGACGTGGAGATCGCGACG
 TACAAACAGCTGCTGGAGGGTGGTGGACGTGAGTCTACCGACACCATGGACGGGCTCGTGCCGACTTCATCCAAC
 GTCTCCATCAAATACTACAGCAGCGGAGGCTTTGGCAGCAGCTCTGGTGGCCATTGCAAGATGGGGTCTGCCAGT
 ATGATCTCAGGGGGCAAGGTGAGCGGATTCGACAAAACAAGAAGGTGCTCATTAAGACCATCGAGACGGAGAAC
 GAGCAAATCGTGTGAGAAAAACACACGGAGAAGTAAGTTCGGCACTTGTATGTCATCGGTGCCTGTGGCTGTTTT
 ACAAAGAAAAACGAAACGAAGCTTCCACCATCGGTGAGTCACTTCTAACCATCACTTTCATTCCTTCCAAGT

CTGGGAAGGGTCATCGACGTTTCGCGACGAGTTCTTCACATGCTGCCCGTTCCCTCGTGATTTATAATCATGTCCC
 ACGCGATGGAGAGAGCTCCGATTAAAATGGAGACCGAGATCGTGGCGCACAGTAATGCAGCTCTCTCTACGTTCG
 GGGGGACGCGTTTAAACAATATCGGGCGCGTGCAGCGCACGATAGTTTGTGTTTCAACGGAGAGAAAAGTTAAC
 ATGCAAAGGCTCGTGGTTTTGGAAAATTACGTTTGGAGAACTTGTGTTGAGGAACTTTGGCCTGGCTATCGTGAC
 AAGTTCTTTGTGTGCTCTCTCTACCCGCATAGGTTTGGCTGCAAATGTCATTGGTTGCTTCAAGTTAATACCC
 TCTCCCCCTTCTCTCCCCCGGGCAATGCTTACGTGACGACGTGCATTCCCTCCGGCTAACGCATGGCCTCTGA
 TGATTATGCGCAGCCTCGTCCGTAGACTACGCACATGGGTGAGCGACCCTTGCTGATCTGCTTTGCTGTGGAG
 TGAATAAACATCACGTGAACC

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

8.4 Typ III-Proteine Vimentin und Desmin

>*lfl-v*

GCCGCTCTCTTCCCGCAGTCAAGCACTTGTAGCACCACCACCACCGCCAACAACCTCGAAGCGTCGCCATGTCG
 TCCTCGCAGCGAGTCTCATCGTACCGTCGCAGTTTCGGCCCCGTGGCCAGCTCGTCCGCCACCCGCTCCTTCTCG
 TCCCGTTCCCTCGGGCTATGGAGGATTTCGGGGGAGGAGGCGCCGGCTTCGGGGGAAGCATCGGAGGCGGCGCGGC
 ATGATCCGATCATCTCGCTCCGTGGGCTTGGGCAGCAGCGCCAGTCGGGCTACGGCGCCGACGCTCGTCGGCC
 TCGTACGTGAAGGCGTTGTTCGGGCCAGAACGTGGACTTCTCGCTGGCGGACGCGCTCAACGCCGACTACCGCACG
 ACGCGCACCAACGAGAAGGTGGAGCTGCAGGAGCTCAACGATCGCTTCGCGAGCTACATCGACAAGGTGCGCTTC
 CTGGAGCAGCAGAACAAGGCGCTCACCGTGGAGATCACCCAGCTCAAGGGGCGCGAGCCGACCCGCGTGGACGGC
 ATCTACGACCAGGAGCTAAGGGAGCTGCGCCTGCAGGTGGACCGTCTCACGGGCGAGAAGGCGCGGGAGACCTG
 GAGAGGGCCAACCTGCTGGACGATCTGCAGCGCCTTCAGCAGAGGCTTCAGGAAGAGCTGGGCGGGCGAGAGGAG
 GCTGAAAAGAACCTGCGCGCCTTCCGTCAGGACGTTGACGATGCAACCCTGGCACGTGTGGACCTGGAACGCAAA
 GTGGAGTCTCTGCTGGAGGAGATCGCCTTCCCTCAAGAAGATCCATGATGAGGAACTACGCGAGGTGCAGGTGCAG
 GTGCAAGAGCAAGCCGTGCACGTGGAGTACGACATCGACGAAACTGTCAAGCCCACCTGACTGCGGCACCTGCGC
 GACATCCGTGCCGAGTACGAGGGGATCGCCTCAAAGAACGTGGCGGAGGCGGAGGTGTTACAAGTCCAAGTTT
 GCAGATATGAGTGAAGCGGCTTCCCGCAACAACGACGCTCTGCGTGCGCCAAGCAAGAGCTGAATGACTACCCGG
 CGCCAGGTGCAGGCCAGCAATGCGAGATTGACGCGCTCAAGGGCGGGAACGAGTCTCTGGAGCGACAGATGCGC
 GAGATGGAGGACCGCTTTGGGCTGGAGGCGGCCGGATACCAGGACACGATTGCGCGCCTTGAGGACGACATCCGA
 AACCTCAAGGATGAGATGACGCGCCACCTGCGGGAGTACCAGGAGCTGCTCAACGTGAAGATGGCGCTCGACATC
 GAGATTGCCACCTACCGCAAGCTCCTGGAGGGCGAGGAGACTCGGATTGCTCTTCCGGTGCAGCAGTTCTCTTCT
 ACGTCGTACAACCTCCGAGAATCGAGCCCTTCCATTGATCGCTTGGCCAGCACCTTCAACAAGAAGACGGTCCCTC
 ATCAAGACCATTGAGACTCACGACGGCGAGGTCAATCAGTCGACTCAGGAGGAGGAGATCTGAGTTTCCCAT
 CGTCCACCTGCATGGCGGCTCCATCACGCGGACGCTGTTGAACGCTGTGATGAATGGCCGCTTGCATGCAGAGGA
 GGCAAACACGGTGGCAGCCTGCAAAAGCATCTTGTCCAGCTGCTGTACCAACCCCATGCCCTTGGTCTACTTAC
 CTTGACACAAATAGATCCTCTATCCTTTCTTTGAAGAGTAGGTTTCAGCTCGTGCAGACCGGCTCCTTTGTTAAT
 GTTCGTTGTTGTATACTTGCCTTTACGTACAATCAGACCTATCACCAAATAAAGATGACTTTC

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>*p-lfl-d*

GAAAAGGAGAGTTGCAGCATCTGAACGACCGTTTCGCGAGCTACATCGACAAGGTGCGCTCGCTCGAGTCGCAGA
 ACCGTGCGCTCGTGGCGGAGGTGAGCCGCGTCAAGGGACAGGGGCCCGGCGAGTGGCGGACGTCTACGAGGAGG
 AGATCCGCGAGCTGCGGCTGCAGGTGGATCAGCTGGCGAGCGAGAGGGCGCGTGCAGGACGTGCAGAGATAATC
 TCGCGGATGAGCTGGCGAAGTTGAGGCAGAGGTTGCAGGATGAGATTGAGCTGAAAGTTGACGCGAGAGAGATC
 TCGCGGGATTCCGACAGGACGTAGACGACGCGACGCTGGCCCCGAGTCGACCTGGAGCGACGCATCGAGTCGCTGA
 ACGAGGAGATCGCCTTCCCTCAAGAAGGCGCACGACGAGGAGGTGCGCGAGCTGCAGGCGATGATGCAGGAACAGC
 AGGTACCGTTGAGGTGGACACGGTGAAGCCAGACTTGGCGGCCGCCCTTCGCGACGTGAGGGCCCCAGTACGAGT
 CCATCGCATCCTCGAACCTGCAGGAGGCCGAGACGTGGTTCAAGTCCAAGCTGGCGGACGTGACGGACACGGCGG
 GCCGCAACAAGGATGAGCTGAGACAGGCCAAGCAGGACGTGTGCGAGCAGCGGAGACAGATTGAGACTACACCA
 TGGAAGTCGACTCGCTCAAGAGCGCAAACGAGTCCCTGCTGAGACAGATGCGCGAGATGGAGGACCCTTCTCTG
 TCGAGGCGTCCGGCTACCAGGAGGCCATCGGCTCGCTGGAGGAGGACATCCGCCGGCTCAAGGACGACATGGCGA
 GGCACCTGCGGCAATACCAGGACCTGCTGAACGTGAAGATGGCGCTTACGCTGGAGATAGCCACCTACCGCAAGC
 TGCTGGAGGGAGAGGAGAGCCGAATCTCCACCCCAACGCACTCGCACTTTGGAAGCATTCACATCCATGAGAGCA
 GCCCTGAACATCTGCAGCAGCAGCTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCGAGCGAGGTGATGGCGAAGA
 AAACGGTGGTGTCAAGACAATTGAGACTCGT

GATGGAGAGGTCGTCAGTGAG

8.5 Typ IV L-Neurofilament-Protein (light)

>lfl-nf_l

```
GGCGACTCCGACCACGAGAGACATTGTCACAGACGCCGCGTTTCAGCAGCAGCAGCAGCCCCCGTTCCAAGGGG
CAGACGTCGCACCAACCTCCCGCCATGTACGCGAACGAGCGCCGCTCCGTGAGCTCCCTGCGCTCCAGCAGCCG
TCGCGCCGCGTCTCCCCGCGTCCGTGCGCTTTGCCGCGACGCCCTCCTCCTACTCGTACCCGGGGCTCGGGGCC
GTGAGCCTCTCCTACGCCTCGGGCGCCCACTCCGCTCCTCCTCCTACTACCAGTCGTCCGGACTCGGTTTCGCC
GAAGCCTTTGACTTTGCGCAGGCGAACTCGCTCAACACCGAGATGCTGGCGCTGCGCTCGCAGGAGCACGAGGAC
CTCAAGGGGCTGAACGACCGCTTCGCGGGCTTCATCGAGAAGGTGCACTCCCTGGAGCAGCAGAACCCTGCTC
GAGACCGAGCTGCTGGCGCTGCGCAAGTTCGAGTCGGGCGGTGCCGGCGGGGAGGGCAGCAGCGGCTGCGGGAG
CTCTACGAGCGCGAGCTGCGTGAGCTGCGCGCCCAGGCGGACGAGGAGCAGGCGGAGAAAGGCGCGCATGGAAGCG
GCTCGGGACCAGCTCCGCGGCGTCTGGAGCGCACCCAGGCGAAGCTGGAGGAGGAGGCGCGGGCGAGGGAGCGC
GCCGAGGAGGAGGCGCTCCGGGCGCGGAGGACGCGGAGAGAGCGGCGCTCGCGAACGCCGAGTTGGACCGCAGG
ATCGCGTCTCTGCTGGACGAGATCGCTTTCTGAAGCGCTGCACGACATGGAGATCTCGGAGCTGCTGCCCCAG
ATCCGCTCCGTACCGCCGTGGTGGAGATGGCGGGGAGGCGTCCGCTCCGGACTGGTACCGCACCAGTCCAG
ATCCGCTCGCAGTACGAGAAGCTGGCGGCCAAGAACATGCAGGTGGCCGAGGACTGGTACCGCACCAGTCCAG
GTGGTGACGGAGAGCGCGGCCCGCAGCACGGAGACCGTGCCTCCATCCGCGAGGAGAGCTCCGAGTACAAGAGG
CTCATCCAGTCGAGGACGTCGGAGATCGAGGGCTCAAGAACATCAACGAGTCGCTGCTCAAGCAGATCCAGGAC
CTGGACGAGAAGCACGGCGACGATCTCGCCAAGCAGCAGGAGCGGATCCATGAGTTGGAGGACCACATCCGTGAC
GCCAAAAGGAGATGGCGCGCTACCTCAAGGAGTACCAGGACCTGCTCAATGTCAAAATGGCGCTCGACATCGAG
ATCGCCGCTTACAGGAACTCCTGGAGGGTGAAGAGATCCGGTACAGCTACTCGCAGACTCCGCTCTTCATCTGA
CGCGCCGTGGGGCGAACGCGCGTACGCTGGACCCGCCGCGGACACCCGGACCCACAACCTCTGCCTGTATCGAG
ACATCCCTCTGCCACCGGCCGACTCTGCCTTACCAGTGCTGTGAACAGCAGCGTGGCATGTGTGGCACTTAT
ACAGACATCAGCTAGCTTAGCAGTGCGATTCTGACCACTTATTGTTACTGGACTGGAAACGAAATAAAATCTAAT
CAATCATGGAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

9. Internetadressen

Methode bzw. Programm	Internet-Adresse
Align	http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi
Blast	http://www.blast.genome.ad.jp
Chromas	http://www.technelysium.com.au/chromas.html
ClustalX	http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html
Exspasy-tools	http://www.expasy.ch/tools/
EMBL-Sequenzdatenbank	http://www.ebi.ac.uk/embl/
FindMod	http://www.expasy.ch/tools/findmod/
Genedoc	http://www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml
Lalign	http://www2.igh.cnrs.fr/bin/lalign-guess.cgi
Mega	http://www.megasoftware.net
Oligonucleotid properties	http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligo.html
PCR-Animation	http://vector.cshl.org/Shockwave/pcranwhole.html
Primer Selection	http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html
PeptIdent	http://www.expasy.ch/tools/peptident.html
PeptideMass	http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html
phylip	http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html
Translate	http://www.expasy.ch/tools/dna.html
Treeview	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
WebCutter	http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html
Zoologie, Abt. 2, Uni Mainz	http://www.uni-mainz.de/FB/Biologie/Zoologie/abt2

Da Internetadressen schnell veralten, empfiehlt es sich, nicht mehr funktionierende „Links“ über Suchmaschinen zu verifizieren.

10. Herkunftsnachweis der Neunaugen

Wilhelm Grube

Aale * Forellen * Lachs

Fischwirtschaftsmeister
Fliegenberg 8
21435 Stelle

Frisch aus dem Rauch
Tel. und Fax: 04174/22 04

· Fischwirtschaftsmeister Wilhelm Grube · Fliegenberg 8 · 21435 Stelle ·

Hiermit bestätige ich, dass die Neunaugen
von mir als Beifang in den Fildreisen
gefangen wurden.

Die Neunaugen stammen aus der Elbe bei
Stromkilometer 602.

W. Grube

FISCHWIRTSCHAFTSMEISTER
WILHELM GRUBE
Fliegenberg 8
21435 STELLE
Tel: 04174 - 22 04

G Literatur

- Adjaye, J., Plessmann, U., Weber, K. und Dodemont, H. (1995). "Characterisation of neurofilament protein NF70 mRNA from the gastropod *Helix aspersa* reveals that neuronal and non-neuronal intermediate filament proteins of cerebral ganglia arise from separate lamin-related genes." *J Cell Sci*, **108**(Pt 11), 3581-3590.
- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B. und de Rosa, R. (2000). "The new animal phylogeny: Reliability and implications." *PNAS*, **97**(9), 4453-4456.
- Alarcon, V. B. und Filosa, M. F. (1994). "Keratin polypeptides in the epidermis of the larval (ammocoete) sea lamprey, *Petromyzon marinus*, show a cell type-specific immunolocalization." *Can J Zool*, **72**, 190-194.
- Alarcon, V. B., Filosa, M. F. und Youson, J. H. (1997). "Cytokeratins in the liver of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) before and after metamorphosis." *Cell Tissue Res*, **287**, 365-374.
- Asch, W. S., Leake, D., Canger, A. K., Passini, M. A., Argenton, F. und Schechter, N. (1998). "Cloning of zebrafish neurofilament cDNAs for plasticin and gefiltin: increased mRNA expression in ganglion cells after optic nerve injury." *J Neurochem*, **71**(1), 20-32.
- Bader, B. L., Jahn, L. und Franke, W. W. (1988). "Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene." *Eur J Cell Biol*, **47**(2), 300-319.
- Barlow, J. J., Mathias, A. P., Williamson, R. und Gammack, D. B. (1963). "A Simple Method for the Quantitative Isolation of Undegraded High Molecular Weight Ribonucleic Acid." *Biochem Biophys Res Commun*, **13**, 61-66.
- Bauer, H. (1996). "Biochemische und immunhistologische Charakterisierung von Intermediärfilamentproteinen des Karpfen *Cyprinus carpio*.", Diplomarbeit, Mainz.
- Becker, B., Bellin, R. M., Sernett, S. W., Huiatt, T. W. und Robson, R. M. (1995). "Synemin contains the rod domain of intermediate filaments." *Biochem Biophys Res Commun*, **213**, 796-802.
- Bilak, S. R., Sernett, S. W., Bilak, M. M., Bellin, R. M., Stromer, M. H., Huiatt, T. W. und Robson, R. M. (1998). "Properties of the novel intermediate filament protein synemin and its identification in mammalian muscle." *Arch Biochem Biophys*(355), 63-67.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucl Acids Res*, **3**, 1513-1523.
- Bottger, V. und Lane, E. B. (1994). "A monoclonal antibody epitope on keratin 8 identified using a phage peptide library." *J Mol Biol*, **235**(1), 61-67.
- Bovenschulte, M., Riemer, D. und Weber, K. (1995). "The sequence of a cytoplasmic intermediate filament (IF) protein from the annelid *Lumbricus terrestris* emphasizes a distinctive feature of protostomic IF proteins." *FEBS Lett*, **360**, 223-226.
- Brauer, J. (1993). "Biochemische und immunhistologische Charakterisierung der Cytokeratine des Neunauges *Lampetra fluviatilis*.", Diplomarbeit, Mainz.
- Cameron, C. B., Garey, J. R. und Swalla, B. J. (2000). "Evolution of the chordate body plan: new insights from phylogenetic analyses of deuterostome phyla." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(9), 4496-4474.
- Capetanaki, Y., Milner, D. J., Weitzer, G., Tran, D. und Bradley, A. (1997). "Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin." *Cell Struct Funct*, **22**(1), 103-116.
- Cary, R. B. und Klymkowsky, M. W. (1994). "Differential organization of desmin and vimentin in muscle is due to differences in their head domains." *J Cell Biol*, **126**(2), 445-56.
- Cathala, G., Savouret, J., Mendez, B., West, B. L., Karin, M., Martial, J. A. und Baxter, J. D. (1983). "A Method for Isolation of Intact, Translationally Active Ribonucleic Acid." *DNA*, **2**, 329-335.

- Cerda, J., Conrad, M., Markl, J., Brand, M. und Herrmann, H. (1998). "Zebrafish vimentin: molecular characterization, assembly properties and developmental expression." *Eur. J. Cell Biol.*, **77**, 1-13.
- Charnas, L. R., Szaro, B. G. und Gainer, H. (1992). "Identification and developmental expression of a novel low molecular weight neuronal intermediate filament protein expressed in *Xenopus laevis*." *Neurosci*, **12**, 3010-3024.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L. (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**(8), 2110-2114.
- Colucci Guyon, E., Portier, M. M., Dunia, I., Paulin, D., Pourmin, S. und Babinet, C. (1994). "Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype." *Cell*, **79**(4), 679-694.
- Conrad, M., Lemb, K., Schubert, T. und Markl, J. (1998). "Biochemical identification and tissue-specific expression patterns of keratins in the zebrafish *Danio rerio*." *Cell Tiss Res*, **293**, 195-205.
- Conway, E. Y. und Parry, D. A. D. (1988). "Intermediate filament structure. 3. Analysis of sequence homologies." *Int J Biol Macromol*, **10**, 79-98.
- Coulombe, P. A., Chan, Y. M., Albers, K. und Fuchs, E. (1990). "Deletions in epidermal keratins leading to alterations in filament organization in vivo and in intermediate filament assembly in vitro." *J Cell Biol*, **111**(6 Pt 2), 3049-3064.
- Coulombe, P. A. und Fuchs, E. (1990). "Elucidating the early stages of keratin filament assembly." *J Cell Biol*, **111**(1), 153-169.
- Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M. und Orcutt, B. C. (1979). "A model of evolutionary change in proteins." Atlas of Protein Sequence and Structure, M. O. Dayhoff, ed., 345-352.
- Debus, E., Weber, K. und Osborn, M. (1983). "Monoclonal antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament protein." *EMBO J*, **2**, 2305-2312.
- Delarbre, C., Escriva, H., Gallut, C., Barriel, V., Kourilsky, P., Janvier, P., Laudet, V. und Gachelin, G. (2000). "The Complete Nucleotide Sequence of the Mitochondrial DNA of the Agnathan *Lampetra fluviatilis*: Bearings on the Phylogeny of Cyclostomes." *Mol Biol Evol*, **17**(4), 519-529.
- Dodemont, H., Riemer, D. und Weber, K. (1990). "Structure of an invertebrate gene encoding cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins: implications for the origin and the diversification of IF proteins." *EMBO J*, **9**(12), 4083-4094.
- Downing, S. W. und Novalés, R. R. (1971). "The Fine Structure of Lamprey Epidermis. I. Introduction and Mucous Cells. II. Club Cells. III. Granular Cells." *J Ultrastruct Res*, **35**, 282-313.
- Downing, S. W., Spitzer, R. H., Koch, E. A. und Salo, W. L. (1984). "The hagfish slime gland thread cell. I. A unique cellular system for the study of intermediate filaments and intermediate filament-microtubule interactions." *J Cell Biol*, **98**(2), 653-69.
- Dumeril, A. M. C. (1806). *Zoologie analytique ou méthode naturelle de classification des animaux.*, Didot, Paris.
- Eck, R. V. und Dayhoff, M. O. (1966). *Atlas of Protein Sequence and Structure 1966.*, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.
- Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T. und Martin, P. (2000). "Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin." *J Cell Sci*, **113**(Pt 13), 2455-2462.
- Eichner, R., Bonitz, P. und Sun, T. T. (1984). "Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression." *J Cell Biol*, **98**(4), 1388-1396.
- Erber, A., Riemer, D., Bovenschulte, M. und Weber, K. (1998). "Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins." *J Mol Evol*, **47**(6), 751-762.
- Erber, A., Riemer, D., Hofemeister, H., Bovenschulte, M., Stick, R., Panopoulou, G., Lehrach, H. und Weber, K. (1999). "Characterization of the Hydra lamin and its gene: A molecular phylogeny of metazoan lamins." *J Mol Evol*, **49**(2), 260-271.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal Biochem*, **132**, 6-13.

- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity: Addendum." *Anal Biochem*, **137**, 266-267.
- Felsenstein, J. (1978). "Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading." *Syst Zool*, **27**, 401-410.
- Ferrari, S., Battini, R., Kaczmarek, L., Rittling, S., Calabretta, B., de Riel, J. K., Philiponis, V., Wei, J. F. und Baserga, R. (1986). "Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene." *Mol Cell Biol*, **6**(11), 3614-3620.
- Ferretti, P., Brockes, J. P. und Brown, R. (1991). "A new type II keratin restricted to normal and regenerating limbs and tails is responsive to retinoic acid." *Development*, **111**(2), 497-507.
- Fitch, W. M. (1971). "Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology." *Syst Zool*, **20**, 406-416.
- Fliegner, K. H. und Liem, R. K. (1991). "Cellular and molecular biology of neuronal intermediate filaments." *Int Rev Cytol*, **131**, 109-167.
- Fouquet, B. (1991). "Expression von Intermediärfilament-Proteinen in *Xenopus laevis*." Dissertation, Faculty of Biology, Heidelberg.
- Franke, W. W., Schmid, E., Osborn, M. und Weber, K. (1978). "Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 5034-5038.
- Franz, J. K. und Franke, W. W. (1986). "Cloning of cDNA and amino acid sequence of a cytokeratin expressed in oocytes of *Xenopus laevis*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**(17), 6475-6479.
- Fuchs, E. und Cleveland, D. W. (1998). "A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease." *279*(5350), 514-519.
- Fuchs, E. und Weber, K. (1994). "Intermediate filaments: Structure, dynamics, function and disease." *Annu Rev Biochem*, **63**, 345-382.
- Galou, M., Colucci Guyon, E., Ensergueix, D., Ridet, J. L., Gimenez y Ribotta, M., Privat, A., Babinet, C. und Dupouey, P. (1996). "Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice." *J Cell Biol*, **133**(4), 853-863.
- Galou, M., Gao, J., Humbert, J., Mericskay, M., Li, Z., Paulin, D. und Vicart, P. (1997). "The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies." *Biol Cell*, **89**(2), 85-97.
- Garstang, W. (1928). "The morphology of the Tunicata." *Q J Micr Sci*, **72**, 51-189.
- Geisler, N., Kaufmann, E. und Weber, K. (1985). "Antiparallel orientation of the double-stranded coiled-coil in the tetrameric protofilament unit of intermediate filaments." *J Mol Biol*, **182**, 173-177.
- Geisler, N. und Weber, K. (1981). "Isolation of polymerization-competent vimentin from porcine eye lens tissue." *FEBS Lett.*, **125**, 253-256.
- Geisler, N. und Weber, K. (1982). "The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins." *EMBO J*, **1**, 1649-1656.
- Glasgow, E., Druger, R. K., Levine, E. M., Fuchs, C. und Schechter, N. (1992). "Plasticin, a novel type III neurofilament protein from goldfish retina: increased expression during optic nerve regeneration." *Neuron*, **9**(2), 373-381.
- Groff, J. M., Nayan, D. K. und Higgins, R. J. (1997). "Cytokeratin-filament expression in epithelial and non-epithelial tissues of the common carp (*Cyprinus carpio*)." *Cell Tissue Res*, **287**, 375-384.
- Haberkamp, M., Tappe, N., Schaffeld, M. und Markl, J. "Intermediate filament proteins of the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*)." *Zoology*, **104**, Suppl. IV (DZG 94.1), 28.
- Hanukoglu, I. und Fuchs, E. (1982). "The cDNA sequence of a human epidermal keratin: divergence of sequence but conservation of structure among intermediate filament proteins." *Cell*, **31**, 243-252.
- Hanukoglu, I. und Fuchs, E. (1983). "The cDNA sequence of a type II cytoskeletal keratin reveals constant and variable structural domains among keratins." *Cell*, **33**, 915-924.

- Hardisty, M. W. (1982). "Lampreys and hagfishes: analysis of cyclostome relationships." The biology of lampreys, M. W. Hardisty, I. C. Potter, eds., Academic Press, London, 166-260.
- Hatzfeld, M. und Burba, M. (1994). "Function of type I and type II keratin head domains: their role in dimer, tetramer and filament formation." *J Cell Sci*, **107**(Pt 7), 1959-1972.
- Hatzfeld, M. und Franke, W. W. (1985). "Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides." *J Cell Biol*, **101**(5 Pt 1), 1826-1841.
- Hatzfeld, M., Maier, G. und Franke, W. W. (1987). "Cytokeratin domains involved in heterotypic complex formation determined by in-vitro binding assays." *J Mol Biol*, **197**(2), 237-55.
- Hatzfeld, M. und Weber, K. (1990a). "The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression." *J Cell Biol*, **110**(4), 1199-210.
- Heid, H. W., Moll, I. und Franke, W. W. (1988a). "Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles." *Differentiation*, **37**, 131-157.
- Heid, H. W., Moll, I. und Franke, W. W. (1988b). "Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. II. Concomitant and mutually exclusive synthesis of trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicles, nail bed and nail matrix, lingual papilla, thymic reticulum)." *Differentiation*, **58**, 113-131.
- Hemken, P. M., Bellin, R. M., Sernett, S. W., Becker, B., Huiatt, T. W. und Robson, R. M. (1997). "Molecular characteristics of the novel intermediate filament protein paranemin. Sequence reveals EAP-300 and IFAPa-400 are highly homologous to paranemin." *J Biol Chem*, **272**(51), 32489-32499.
- Hemmati - Brivanlon, A., Mann, R. W. und Harland, R. M. (1992). "A protein expressed in the growth cones of embryonic vertebrate neurons defines a new class of intermediate filament protein." *Neuron*, **9**, 417-428.
- Herman, J.-P., Victor, J. C. und Sanes, J. R. (1993). "Developmentally regulated and spatially restricted antigens of radial glial cells." *Dev Dyn*, **197**, 307-318.
- Herrmann, H. (1995). "Strukturbildende und topogene Domänen von Intermediärfilamentproteinen.", Habilitationsschrift, Heidelberg.
- Herrmann, H. und Aebi, U. (2000). "Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics." *Curr Opin Cell Biol*, **12**(1), 79-90.
- Herrmann, H., Fouquet, B. und Franke, W. W. (1989a). "Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. I. cDNA clones encoding different forms of vimentin." *Development*, **105**(2), 279-298.
- Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Muller, S. A., Goldie, K. N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W. W. und Aebi, U. (1996a). "Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains." *J Mol Biol*, **264**(5), 933-953.
- Herrmann, H., Münick, M. D., Brettel, M., Fouquet, B. und Markl, J. (1996b). "Vimentin in a cold-water fish, the rainbow trout: highly conserved primary structure but unique assembly properties." *J. Cell Sci.*, **109**, 569-578.
- Herrmann, H., Strelkov, S. V., Feja, B., Rogers, K. R., Brettel, M., Lustig, A., Haner, M., Parry, D. A., Steinert, P. M., Burkhard, P. und Aebi, U. (2000). "The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly." *J Mol Biol*, **298**(5), 817-832.
- Herrmann, H. und Wiche, G. (1987). "Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin." *J Biol Chem*, **262**, 1320-1325.
- Hesse, M., Franz, T., Tamai, Y., Taketo, M. M. und Magin, T. M. (2000). "Targeted deletion of keratins 18 and 19 leads to trophoblast fragility and early embryonic lethality." *EMBO J*, **19**(19), 5060-5070.

- Hesse, M., Magin, T. M. und Weber, K. (2001). "Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18." *J Cell Sci*, **114**(14), 2569-2575.
- Hillis, D. M., Huelsenbeck, J. P. und Cunningham, C. W. (1994). "Application and accuracy of molecular phylogenies." *Science*, **264**, 671-676.
- Höffling, S., E. (2001). "Sequenzierung verschiedener Typ I-Keratine von Regenbogenforelle, Katzenhai und Flösselhecht.", Staatsexamensarbeit, Mainz, Mainz.
- Hoffmann, W., Franz, J. K. und Franke, W. W. (1985). "Amino acid sequence microheterogeneities of basic (type II) cytokeratins of *Xenopus laevis* epidermis and evolutionary conservativity of helical and non-helical domains." *J Mol Biol*, **184**(4), 713-24.
- Holy, J. (2000). "Intermediate filament proteins in echinoderm coelomocytes." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **127**(4), 491-504.
- Imboden, M., Goblet, C., Korn, H. und Vríz, S. (1997). "Cytokeratin 8 is a suitable epidermal marker during zebrafish development." *C R Acad Sci III*, **320**(9), 689-700.
- Irvine, A. D. und McLean, W. H. (1999). "Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation." *Br J Dermatol*, **140**(5), 815-828.
- Jacobs, A. J., Kamholz, J. und Selzer, M. E. (1995). "The single lamprey neurofilament subunit (NF-180) lacks multiphosphorylation repeats and is expressed selectively in projection neurons." *Brain Res Mol Brain Res*, **29**(1), 43-52.
- Janvier, P. (1996). "The dawn of the vertebrates: character versus common ascent in the rise of current vertebrate phylogenies." *Paleontol*, **39**, 259-287.
- Johnson, L. D., Idler, W. W., Zhou, X. M., Roop, D. R. und Steinert, P. M. (1985). "Structure of a gene for the human epidermal 67-kDa keratin." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 1896-1900.
- Jones, D. T., Taylor, W. R. und Thornton, J. M. (1992). "The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences." *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)*, **8**, 275-282.
- Julien, J. P., Grosveld, F., Yazdanbaksh, K., Flavell, D., Meijer, D. und Mushynski, W. (1987). "The structure of a human neurofilament gene (NF-L): a unique exon-intron organization in the intermediate filament gene family." *Biochim Biophys Acta*, **909**(1), 10-20.
- Kammerer, R. A., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Engel, J., Aebi, U. und Steinmetz, M. O. (1998). "An autonomous folding unit mediates the assembly of two stranded coiled coils." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13419-13424.
- Karabinos, A., Riemer, D., Erber, A. und Weber, K. (1998). "Homologues of vertebrate type I, II and III intermediate filament (IF) proteins in an invertebrate: the IF multigene family of the cephalochordate *Branchiostoma*." *FEBS Lett*, **437**(1-2), 15-18.
- Karabinos, A., Riemer, D., Panopoulou, G., Lehrach, H. und Weber, K. (1999). "Characterisation and tissue-specific expression of the two keratin subfamilies of intermediate filament proteins in the cephalochordate *Branchiostoma*." *Eur J Cell Biol*, **79**(1), 17-26.
- Kartenbeck, J. (1989). "Intermediate filament proteins. Diagnostic markers in tumour pathology." *Interdisc Sci Rev*, **14**(3), 278-283.
- Khyse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-209.
- Kimura, M. (1980). "A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences." *J Mol Evol*, **16**, 111-120.
- Klymkowsky, M. W. (1995). "Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions." *Curr Opin Cell Biol*, **7**(1), 46-54.
- Koch, E. A., Spitzer, R. H. und Pithawalla, R. B. (1991b). "Structural Forms and Possible Roles of Aligned Cytoskeletal Biopolymers in Hagfish (Slime Eel) Mucus." *J Struct Biol*, **106**, 205-210.

- Koch, E. A., Spitzer, R. H., Pithawalla, R. B., Castillos, F. A. und Parry, D. A. D. (1995). "Hagfish biopolymer: a type I/type II homologue of epidermal keratin filaments." *Int J Biol Macromol*, **17**, 283-292.
- Koch, E. A., Spitzer, R. H., Pithawalla, R. B. und Downing, S. W. (1991a). "Keratin-like components of gland thread cells modulate the properties of mucus from hagfish (*Eptatretus stouti*)." *Cell Tissue Res*, **264**(1), 79-86.
- Koch, E. A., Spitzer, R. H., Pithawalla, R. B. und Parry, D. A. D. (1994). "An unusual intermediate filament subunit from the cytoskeletal biopolymer released extracellularly into seawater by the primitive hagfish (*Eptatretus stouti*)." *J Cell Sci*, **107**(Pt 11), 3133-3144.
- Korge, B. P. und Krieg, T. (1996). "The molecular basis for inherited bullous diseases." *J Mol Med*, **74**(2), 59-70.
- Krauss, S. und Franke, W. W. (1990). "Organization and sequence of the human gene encoding cytokeratin 8." *Gene*, **86**(2), 241-249.
- Kulesh, D. A. und Oshima, R. G. (1989). "Complete structure of the gene for human keratin 18." *Genomics*, **4**(3), 339-347.
- Kuraku, D., Hoshiyama, D., Katoh, K., Suga, H. und Miyata, T. (1999). "Monophyly of Lampreys and Hagfishes Supported by Nuclear DNA-Coded Genes." *J Mol Evol*, **49**, 729-735.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680-685.
- LaFlamme, S. E. und Dawid, I. B. (1990). "Differential keratin gene expression during the differentiation of the cement gland of *Xenopus laevis*." *Dev Biol*, **137**(2), 414-8.
- Langbein, L., Rogers, M. A., Winter, H., Praetzel, S., Beckhaus, U., Rackwitz, H. R. und Schweizer, J. (1999). "The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle." *J Biol Chem*, **274**(28), 19874-84.
- Langley, K. E., Villarejo, M. R., Fowler, A. V., Zamenhof, P. J. und Zabin, I. (1975). "Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**(4), 1254-1257.
- Lazarides, E. (1982). "Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins." *Annu Rev Biochem*, **51**, 219-250.
- Lazarides, E., Granger, B. L., Gard, D. L., O'Connor, C. M., Breckler, J., Price, M. und Danto, S. I. (1982). "Desmin- and vimentin-containing filaments and their role in the assembly of the Z disk in muscle cells." *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, **46**, 351-378.
- Lendahl, U., Zimmermann, L. B. und McKay, R. D. G. (1990). "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein." *Cell*, **60**, 585-595.
- Li, Z., Colucci Guyon, E., Pincon Raymond, M., Mericskay, M., Pournin, S., Paulin, D. und Babinet, C. (1996). "Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin." *Dev Biol*, **175**(2), 362-366.
- Li, Z., Lilienbaum, A., Butler Browne, G. und Paulin, D. (1989). "Human desmin-coding gene: complete coding sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development." *Gene*, **78**(2), 243-254.
- Li, Z., Mericskay, M., Agbulut, O., Butler Browne, G., Carlsson, L., Thornell, L., Babinet, C. und Paulin, D. (1997). "Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle." *J. Cell. Biol.*, **139**(1), 129-144.
- Lin, F. und Worman, H. J. (1995). "Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1." *Genomics*, **27**(2), 230-236.
- Loewinger, L. und McKeon, F. (1988). "Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm." *EMBO J*, **7**(8), 2301-2309.
- Lottspeich, F. (1999). "Proteomanalyse - ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen." *Angew. Chem.*, **111**, 2630-2647.
- Lovtrup, S. (1977). *The Phylogeny of Vertebrata.*, Wiley, New York.

- Maeno, H., Sugimoto, K. und Nakajima, N. (1995). "Genomic structure of the mouse gene (Lmnbl) encoding nuclear lamin B1." *Genomics*, **30**(2), 342-346.
- Mallatt, J. und Sullivan, J. (1998). "28S and 18S rDNA sequences support the monophyly of lampreys and hagfishes." *Mol Biol Evol*, **15**, 1706-1718.
- Marchuk, D., McCrohon, S. und Fuchs, E. (1985). "Complete sequence of a gene encoding a human type I keratin: Sequence homologous to enhancer elements in the regulatory region of the gene." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 1609-1613.
- Markl, J. (1991). "Cytokeratins in mesenchymal cells: impact on functional concepts of the diversity of intermediate filament proteins." *J Cell Sci*, **98**, 261-264.
- Markl, J. und Franke, W. W. (1988). "Localization of cytokeratins in tissues of the rainbow trout: fundamental differences in expression pattern between fish and higher vertebrates." *Differentiation*, **39**, 97-122.
- Markl, J. und Schechter, N. (1998). "Fish intermediate filament proteins in structure, function and evolution." *Intermediate Filaments*, H. Herrmann, J. R. Harris, eds., Plenum Press, New York, 1-33.
- Markl, J., Winter, S. und Franke, W. W. (1989). "The catalog and the expression complexity of cytokeratins in a teleost fish, the rainbow trout." *Eur J Cell Biol*, **50**, 1-16.
- McDonald, W. H. und Yates, J. R. (2000). "Proteomic Tools for Cell Biology." *Traffic*, **1**, 747-754.
- McLean, W. H. und Lane, E. B. (1995). "Intermediate filaments in disease." *Curr Opin Cell Biol*, **7**(1), 118-125.
- Merrick, S. E., Pleasure, S. J., Lurie, D. I., Pijak, D. S., Selzer, M. E. und Lee, V. M. (1995). "Glial cells of the lamprey nervous system contain keratin-like proteins." *J Comp Neurol*, **355**(2), 199-210.
- Moll, R. und Franke, W. W. (1982). "Intermediate filaments and their interaction with membranes. The desmosome-cytokeratin filament complex and epithelial differentiation." *Pathol Res Pract*, **175**(2-3), 146-61.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. und Krepler, R. (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." *Cell* **31**, 11-24.
- Moll, R., Zimbelmann, R., Goldschmidt, M. D., Keith, M., Laufer, J., Kasper, M., Koch, P. J. und Franke, W. W. (1993). "The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas." *Differentiation*, **53**(2), 75-93.
- Myers, M. W., Lazzarini, R. A., Lee, V. M., Schlaepfer, W. W. und Nelson, D. L. (1987). "The human mid-size neurofilament subunit: a repeated protein sequence and the relationship of its gene to the intermediate filament gene family." *EMBO J*, **6**(6), 1617-1626.
- Nei, M. und Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics.*, Oxford University Press, New York.
- Newey, S. E., Howman, E. V., Ponting, C. P., Benson, M. A., Nawrotzki, R., Loh, N. Y., Davies, K. E. und Blake, D. J. (2001). "Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle." *J Biol Chem*, **276**(9).
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." *J Biol Chem*, **250**(10), 4007-21.
- O'Farrell, P. Z., Googman, H. M. und O'Farrell, P. H. (1977). "High resolution two dimensional gelelectrophoresis of basic as well as acidic proteins." *Cell*, **12**, 1133-1142.
- Osborn, M. und Weber, K. (1983). "Tumor diagnosis by intermediate filaments typing: A novel tool for surgical pathology." *Lab Invest*, **48**, 372-394.
- Parry, D. A. D. und Steinert, P. M. (1999). "Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism." *Q REV BIOPHYS*, **32**(2), 99-187.
- Pruss, R. M., Mirsky, R., Raff, M. C., Thorpe, R., Dowding, A. J. und Anderton, B. H. (1981). "All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody." *Cell*, **27**(3 Pt 2), 419-428.

- Quinlan, R. A. und Franke, W. W. (1982). "Heteropolymer filaments of vimentin and desmin in vascular smooth muscle tissue and cultured baby hamster kidney cells demonstrated by biochemical crosslinking." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 3452-3456.
- Rasmussen, A.-S., Janke, A. und Arnason, U. (1998). "The mitochondrial DNA molecule of the hagfish (*Myxine glutinosa*) and vertebrate phylogeny." *J Mol Evol*, **46**, 382-388.
- Rieger, M. und Franke, W. W. (1988). "Identification of an orthologous mammalian cytokeratin gene. High degree of intron sequence conservation during evolution of human cytokeratin 10." *J Mol Biol*, **204**(4), 841-856.
- Riemer, D., Dodemont, H. und Weber, K. (1991). "Cloning of the non-neuronal intermediate filament protein of the gastropod *Aplysia californica*; identification of an amino acid residue essential for the IFA epitope." *Eur J Cell Biol*, **56**(2), 351-357.
- Riemer, D., Wang, J., Zimek, A., Swalla, B. J. und Weber, K. (2000). "Tunicates have unusual nuclear lamins with a large deletion in the carboxyterminal tail domain." *Gene*, **255**(2), 317-325.
- Riemer, D. und Weber, K. (1994). "The organization of the gene for *Drosophila* lamin C: limited homology with vertebrate lamin genes and lack of homology versus the *Drosophila* lamin Dmo gene." *Eur J Cell Biol*, **63**(2), 299-306.
- Riemer, D. und Weber, K. (1998). "Common and variant properties of intermediate filament proteins from lower chordates and vertebrates; two proteins from the tunicate *Styela* and the identification of a type III homologue." *J Cell Sci*, **111**(Pt 19), 2967-2975.
- Rogers, K. R., Herrmann, H. und Franke, W. W. (1996). "Characterization of disulfide crosslink formation of human vimentin at the dimer, tetramer, and intermediate filament levels." *J Struct Biol*, **117**(1), 55-69.
- Saitou, N. und Nei, M. (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol*, **4**, 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor.
- Schaffeld, M., Haberkamp, M., Braziulis, E., Lieb, B. und Markl, J. (2001d). "Type II keratin cDNAs from the rainbow trout: Implications for keratin evolution." *in preparation*.
- Schaffeld, M., Haberkamp, M., Tappe, N., Kusche, K., Schätzlein, S., Bremer, M. und Markl, J. "Intermediate filament protein evolution in fish: Sequence from sturgeon and bichir." *Zoology*, **104**, Suppl. IV (DZG 94.1), 35.
- Schaffeld, M., Herrmann, H., Schultess, J. und Markl, J. (2001b). "Vimentin and desmin of a cartilaginous fish, the shark *Scyliorhinus stellaris*: Sequence, expression patterns and in vitro assembly." *Eur J Cell Biol*, **80**, 1-11.
- Schaffeld, M., Höffling, S., E., Haberkamp, M., Conrad, M. und Markl, J. (2001c). "Type I keratin cDNAs from the rainbow trout: independent radiation of keratins in fish." *in preparation*.
- Schaffeld, M., Löbbecke, A., Lieb, B. und Markl, J. (1998). "Tracing keratin evolution: Catalog, expression patterns and primary structure of shark (*Scyliorhinus stellaris*) keratins." *Eur J Cell Biol*, **77**, 69-80.
- Scheinert, I. (2001). "Die Cytoskelettproteine Vimentin und Desmin beim Flussneunauge *Lampetra fluviatilis*.", Staatsexamensarbeit, Mainz.
- Scheller, K. und Karlson, P. (1977). "Effects of ecdysteroids on RNA synthesis of fat body cells in *Calliphora vicina*." *J Insect Physiol*, **23**(2), 285-291.
- Shu, D. G., Chen, L., Han, J. und Zhang, X. L. (2001). "An Early Cambrian tunicate from China." *Nature*, **411**(6836), 472-473.
- Shuman, S. (1991). "Recombination Mediated by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is Sequence Specific." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10104-10108.
- Shuman, S. (1994). "Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase." *J Biol Chem*, **269**, 32678-32684.

- Spitzer, R. H., Downing, S. W., Koch, E. A., Salo, W. L. und Saidel, L. J. (1984). "Hagfish slime gland thread cells. II. Isolation and characterization of intermediate filament components associated with the thread." *J Cell Biol*, **98**(2), 670-677.
- Spitzer, R. H., Koch, E. A. und Downing, S. W. (1988). "Maturation of hagfish gland thread cells: composition and characterization of intermediate filament polypeptides." *Cell Motil Cytoskeleton*, **11**(1), 31-45.
- Steinert, P. M. (1990). "The two-chain coiled-coil molecule of native epidermal keratin intermediate filaments is a type I-type II heterodimer." *J Biol Chem*, **265**(15), 8766-8774.
- Steinert, P. M. (1991a). "Analysis of the mechanism of assembly of mouse keratin 1/keratin 10 intermediate filaments in vitro suggests that intermediate filaments are built from multiple oligomeric units rather than a unique tetrameric building block." *J Struct Biol*, **107**(2), 175-188.
- Steinert, P. M. (1991b). "Organization of coiled-coil molecules in native mouse keratin 1/keratin 10 intermediate filaments: evidence for alternating rows of antiparallel in-register and antiparallel staggered molecules." *J Struct Biol*, **107**(2), 157-174.
- Steinert, P. M., Chou, P.-Y., Prahlad, V., Parry, D. A. D., Marekov, L. N., Wu, K. C., Jang, S.-I. und Goldman, R. D. (1999b). "A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein: limited co-assembly *in vitro* to form hetero-polymers with Type III vimentin and Type IV α -internexin." *J Biol Chem*, **274**, 9881-9890.
- Steinert, P. M., Idler, W. W., Cabral, G., Gottesman, M. M. und Goldman, R. D. (1981). "In vitro assembly of homopolymer and copolymer filaments from intermediate filament subunits of muscle and fibroblastic cells." *Proc Anat Acad Sci*, **78**, 3692-3697.
- Steinert, P. M., Marekov, L. N., Fraser, R. D. und Parry, D. A. (1993a). "Keratin intermediate filament structure. Crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly." *J Mol Biol*, **230**(2), 436-452.
- Steinert, P. M., Marekov, L. N. und Parry, D. A. D. (1993b). "Diversity of intermediate filament structure: evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments." *J Biol Chem*(268), 24916-24925.
- Steinert, P. M., Marekov, L. N. und Parry, D. A. D. (1999a). "Molecular parameters of Type IV α -internexin and Type IV-Type III α -internexin-vimentin copolymer intermediate filaments." *J Biol Chem*, **274**, 1657-1666.
- Steinert, P. M. und Roop, D. R. (1988). "Molecular and cellular biology of intermediate filaments." *Annu Rev Biochem*, **57**, 593-625.
- Stewart, M. (1993). "Intermediate filament structure and assembly." *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 3-11.
- Stock, D. W. und Whitt, G. S. (1992). "Evidence from 18S ribosomal RNA sequences that lamprey and hagfishes form a natural group." *Science*, **257**, 787-789.
- St-Pierre, J., Vincent, M. und Dufresne, L. (1994). "Effects of 6-dimethylaminopurine on the length of the cell cycle and on the state of phosphorylation of putative intermediate filament proteins in sea urchin embryos." *Cell Motil Cytoskeleton*, **29**(2), 131-140.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H., Geisler, N., Lustig, A., Ivaninskii, S., Zimbelmann, R., Burkhard, P. und Aebi, U. (2001). "Divide-and-conquer crystallographic approach towards an atomic structure of intermediate filaments." *J Mol Biol*, **306**(4), 773-781.
- Szaro, B. G., Pant, H. C., Way, J. und Battey, J. (1991). "Squid low molecular weight neurofilament proteins are a novel class of neurofilament protein." *J Biol Chem*, **266**, 15035-15041.
- Tamai, Y., Ishikawa, T., Bösl, M. R., Mori, M., Nozaki, M., Baribault, H., Oshima, R. G. und Taketo, M. M. (2000). "Cytokeratins 8 and 19 in the Mouse Placental Development." *J Cell Biol*, **151**(3), 563-572.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. G. (1997). "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucl Acids Res*, **24**, 4876-4882.

- Toivola, D. M., Nieminen, M. I., Hesse, M., He, T., Baribault, H., Magin, T. M., Omary, M. B. und Eriksson, J. E. (2001). "Disturbances in hepatic cell-cycle regulation in mice with assembly-deficient keratins 8/18." *Hepatology*, **34**(6), 1174-1183.
- Tolstonog, G. V., Ruan, H., Li, G. und Traub, P. (2001). "Preparation and DNA-binding properties of recombinant intermediate filament protein vimentin of piscian, amphibian, reptilian and avian origin." *in preparation*.
- Tomarev, S. I., Zinovievam, R. D. und Piatigorky, J. (1993). "Primary structure and lens-specific expression of genes for an intermediate filament protein and β -tubulin in cephalopods." *Biochem Biophys Acta*, **1216**, 245-254.
- Traub, P., Kuhn, S. und Grub, S. (1993). "Separation and characterization of homo and hetero-oligomers of the intermediate filament proteins desmin and vimentin." *J Mol Biol*, **230**(3), 837-856.
- Van Muijen, G. N. P., Ruiter, D. J. und Warnaar, S. O. (1987). "Double and triple expression of intermediate filaments in human fetal and nonmalignant adult tissues." *Lab Invest*, **57**, 359-369.
- Vogel, F. und Gemballa, S. (2000). "Locomotory design of 'cyclostome' fishes: Spatial arrangement and architecture of myosepta and lamellae." *Acta Zoologica*, **81**(3), 267-283.
- Wada, H. (1998). "Evolutionary history of free-swimming and sessile lifestyles in urochordates as deduced from 18S rDNA molecular phylogeny." *Mol Biol Evol*, **15**(9), 1189-1194.
- Wada, H. und Satoh, N. (1994). "Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18S rDNA." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(5), 1801-1804.
- Wang, J., Karabinos, A., Schunemann, J., Riemer, D. und Weber, K. (2000). "The epidermal intermediate filament proteins of tunicates are distant keratins; a polymerisation-competent hetero coiled coil of the *Styela* D protein and *Xenopus* keratin 8." *Eur J Cell Biol*, **79**, 478-487.
- Weber, K., Plessmann, U., Dodemont, H. und Kossmagk-Stephan, K. (1988). "Amino acid sequences and homopolymer-forming ability of the intermediate filament proteins from an invertebrate epithelium." *EMBO J*, **7**(10), 2995-3001.
- Weber, K., Plessmann, U. und Ulrich, W. (1989). "Cytoplasmic intermediate filament proteins of invertebrates are closer to nuclear lamins than are vertebrate intermediate filament proteins; sequence characterization of two muscle proteins of a nematode." *EMBO J*, **8**(11), 3221-3227.
- Wilkins, M. R., Lindskog, I., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F. und Appel, R. D. (1997). "Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS-a World-Wide-Web-accessible tool." *Electrophoresis*, **18**(3-4), 403-408.
- Wilkins, M. R. und Williams, K. L. (1997). "Cross-Species Protein Identification using Amino Acid Composition, Peptide Mass Fingerprinting, Isoelectric Point and Molecular Mass: A Theoretical Evaluation." *J theor Biol*, **186**, 7-15.
- Winkles, J. A., Sargent, T. D., Parry, D. A., Jonas, E. und Dawid, I. B. (1985). "Developmentally regulated cytokeratin gene in *Xenopus laevis*." *Mol Cell Biol*, **5**(10), 2575-2581.
- Zaccone, G., Howie, A. J., Mauceri, A., Fasulo, S., Lo Cascio, P. und Youson, J. H. (1995). "Distribution patterns of cytokeratins in epidermis and horny teeth of the adult sea lamprey, *Petromyzon marinus*." *Folia Histochem Cytobiol*, **33**(2), 69-75.
- Zhao, Y. und Szaro, B. G. (1997). "Xefiltin, a new low molecular weight neuronal intermediate filament protein of *Xenopus laevis*, shares sequence features with goldfish gefiltin and mammalian alpha-internexin and differs in expression from XNIF and NF-L." *J Comp Neurol*, **377**, 351-364.