

Identifizierung und Charakterisierung
von Hämocyanin-Genen und deren cDNAs
und
Ferritin-cDNA-Sequenzen in Mollusken
unter Verwendung von Transkriptom und Genom
Daten

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Silke Gabel-Scheurich
geb. am 02.10.1975 in Mainz-Mombach

Mainz, Juni 2024

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatter: [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung: 06.09.2024

Für meine Kinder

Inhalt

Zusammenfassung.....	7
Abstract	8
1. Einleitung.....	9
1.1. Mollusken Klassen	11
1.2. Struktur des Hämocyanins	20
1.3. Genstruktur von Hämocyaninen	22
1.4. Ferritin	24
1.5. Phylogenie der Mollusken.....	26
1.6. Ziel	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Hämocyanine.....	27
2.2. Material und Methoden Ferritin	29
3. Ergebnisse	30
3.1. Ergebnisse der Assemblierung und Analyse der Hämocyanine	30
3.1.1. Hämocyanine der Bivalvia	32
3.1.2. Hämocyanine der Caudofoveata.....	33
3.1.3. Hämocyanine der Cephalopoda	33
3.1.4. Hämocyanine der Gastropoda	35
3.1.5. Hämocyanine der Monoplacophora	44
3.1.6. Hämocyanine der Polyplacophora	46
3.1.7. Untersuchung der Scaphopoda auf respiratorische Proteine.....	48
3.1.8. Untersuchung der Solenogastres auf respiratorische Proteine	48
3.1.9. Phylogenie der Hämocyanine der Mollusken	48
3.2. Ergebnisse der Ferritin Analyse.....	52
3.2.1. Phylogenie der Ferritine der Mollusken.....	58
4. Diskussion.....	60
4.1. Hämocyanine der Mollusken	60
Hämocyanine der Peltospiridae – ein neuer Hämocyanin-Typ.....	60
Mollusken-Hämocyanine: Gene, Isoformen, Exon-Intron-Struktur	62
4.2. Ferritin-Sequenzen in Mollusken	67
4.3. Phylogenetische Untersuchungen der Transkriptom Sequenzen.....	74
5. Fazit	78
6. Ausblick	78
Anhang	80
Abbildungsverzeichnis.....	89

Supplements.....	91
Literaturverzeichnis.....	93
Danksagung.....	115
Lebenslauf.....	116
Erklärung.....	117

Zusammenfassung

Mollusken sind nach den Arthropoden das zweitartenreichste Phylum der Metazoen und besiedeln alle Lebensräume der Erde. Die Erscheinungsformen von Mollusken weisen eine extreme Variationsbreite, von winzigen wurmähnlichen Meeresbodenbewohnern bis hin zu Riesenkalmaren, auf. Diese Vielfalt der Körperformen und Lebensweisen erfordert notwendige Adaptationen an ihre Habitats und Lebensweise. Essenziell ist hierbei die Anpassung an die unterschiedliche Sauerstoffverfügbarkeit. Die respiratorischen Proteine, die sogenannten Blutfarbstoffe, die bisher in Mollusken nachgewiesen wurden, sind verschiedene Hämocyane und Hämoglobine sowie Myoglobine. Innerhalb der Mollusken haben sich im Laufe der Evolution unterschiedliche Hämocyanin-Typen entwickelt. Hämocyane sind sehr große Proteine mit einer Molekülmasse von 3,5 MDa bis zu 8 MDa und mehr. Sie bestehen aus unterschiedlichen Monomeren, die wiederum aus unterschiedlichen funktionellen Einheiten, sogenannten FUs (FU-a bis FU-h) zusammen gesetzt sind. Hämocyane werden oftmals differentiell in verschiedenen Geweben oder Entwicklungsstadien exprimiert. Die Hintergründe für die unterschiedlichen Expressionsmuster der Hämocyanin-Gene in den verschiedenen Arten sind jedoch noch nicht bekannt. Bei einigen Molluskenklassen existiert jeweils „nur“ ein Gen, wobei bei anderen Arten zwei oder mehr unterschiedliche Genorte identifiziert werden konnten. Im Rahmen meiner Arbeit, konnte ich einen neuen Hämocyanin-Typ aus zwei, an „heißen Schloten“ lebenden Tiefsee-Gastropoden *Chrysomallon squamiferum* und *Gigantopelta aegis* (Peltosperidae) nachweisen. In dieser Gastropoden-Familie konnten zwei Gene identifiziert werden, welche für unterschiedliche Hämocyane kodieren. Das erste Gen kodiert für eine Hämocyanin-Untereinheit, bestehend aus acht FUs, analog des lange bekannten „Keyhole limpet-Typs“, wohingegen das zweite Gen für drei weitere, also insgesamt elf FUs kodiert. Diese zusätzlichen FUs resultieren aus Duplikationen des ancestralen FU-c-Exons, was zu einer Erhöhung der molekularen Masse einer Untereinheit um ca. 144 kDa führt. Neben der Analyse der Hämocyane, wurde das Ferritin von 98 Molluskenarten analysiert. In einigen Molluskenarten konnten bis zu vier Ferritin-Typen nachgewiesen werden. Eine eindeutige Zuordnung aller orthologer Ferritinsequenzen konnte allerdings nicht erfolgen und somit, im Gegensatz zur Verwendung von Hämocyanindaten, keine aussagekräftigen, molekularphylogenetischen Stammbäume rekonstruiert werden. Es gelang mir so, im Rahmen meiner Arbeit, 113 neue Sequenzen zu assemblieren, somit die Datenverfügbarkeit für dieses artenreiche Phylum zu erweitern. und darüber hinaus einen neuer Hämocyanin-Typ in Peltosperidae zu identifizieren. Fortführend sind aber noch weitere Untersuchungen der Hämolymphe, verschiedener Gewebe, Expressionsstudien und bioinformatische Analysen vieler Molluskenarten notwendig, um all die immer noch offenen Fragen über die Evolution der Hämocyanin- und Ferritin-Gene und deren Expressionsmuster aufklären zu können.

Abstract

Molluscs are the second most species-rich phylum of metazoans after arthropods and colonize all habitats on earth. The appearance of molluscs shows an extreme range of variation, from tiny worm-like sea floor dwellers to giant squids. This diversity of body forms and lifestyles requires necessary adaptations to their habitats and way of life. The adaptation to the different oxygen availability is essential. The respiratory proteins, the so-called blood pigments, which have so far been detected in molluscs are various hemocyanins and hemoglobins as well as myoglobins.

Different types of haemocyanin have developed within molluscs over the course of evolution. Haemocyanins are very large proteins with a molecular mass of 3.5 MDa to 8 MDa and more. They consist of different monomers, which in turn are composed of different functional units, so-called FUs (FU-a to FU-h).

Hemocyanins are often differentially expressed in different tissues or developmental stages. However, the reasons for the different expression patterns of the haemocyanin genes in the various species are not yet known. In some mollusc classes there is "only" one gene, whereas in other species two or more different gene loci have been identified.

As part of my work, I was able to identify a new type of haemocyanin from two deep-sea gastropods living in "hot vents", *Chrysomallon squamiferum* and *Gigantopelta aegis* (Peltosperidae). In this gastropod family, two genes were identified that code for different hemocyanins. The first gene codes for a hemocyanin subunit consisting of eight FUs, analogous to the long-known "keyhole limpet type", whereas the second gene codes for three more, i.e. a total of eleven FUs. These additional FUs result from duplications of the ancestral FU-c exon, which leads to an increase in the molecular mass of a subunit by approx. 144 kDa.

In addition to the analysis of hemocyanins, the ferritin of 98 mollusk species was analyzed. In some mollusc species up to four ferritin types could be detected. However, it was not possible to clearly assign all orthologous ferritin sequences and therefore, in contrast to the use of haemocyanin data, no meaningful molecular phylogenetic family trees could be reconstructed.

In the course of my work, I succeeded in assembling 113 new sequences, thus greatly expanding the data availability for this species-rich phylum and also identifying a new hemocyanin type in Peltosperidae.

However, further investigations of the hemolymph, various tissues, expression studies and bioinformatic analyses of many mollusc species are still necessary in order to clarify all the still open questions about the evolution of the hemocyanin and ferritin genes and their expression patterns.

1. Einleitung

Das Phylum der Mollusken ist ausgesprochen arten- und formenreich. Mollusken bewohnen alle Regionen der Erde, alle Zonen der Ozeane (von der Gezeitenzone bis in die Tiefsee) und limnische Gewässer, wobei einzig die Gastropoden terrestrische Habitate eroberten (Andersen und Halvorsen 1984; Pearce und Örstan 2006; PONDER et al. 2020). Nach den Arthropoden sind die Mollusken mit mehr als 86.000 rezenten Arten (W.O.R.M.S) die zweitgrößte Tiergruppe (Giribet und Edgecombe 2012), wobei die Schätzungen für die Anzahl der Spezies je nach Quelle zwischen 51.700 nur marine Arten (Appeltans et al. 2012), 55.400 Arten (Mizzaro-Wimmer und Salvini-Plawen 2001) und 128.000 Arten (Hennig 1980) liegen. Eine Übersicht der acht Klassen der Mollusken ist mit den zugerechneten Arten und deren Habitate in Abbildung 1 (nach W.O.R.M.S) dargestellt.

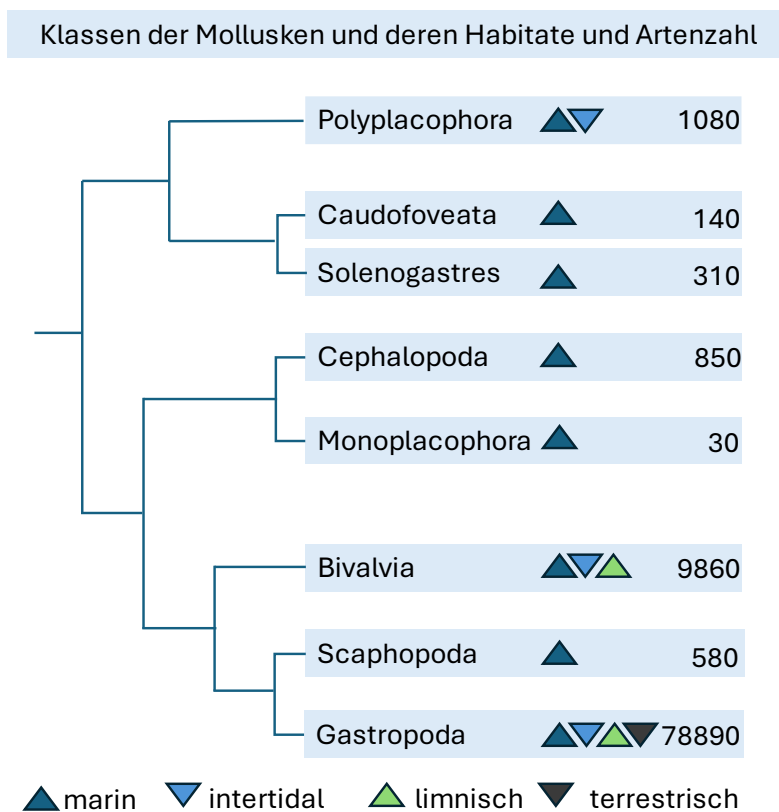


Abbildung 1: Kladogramm der acht Mollusken-Klassen mit Angabe der Habitate und der Anzahl rezenter Arten nach (W.O.R.M.S) adaptiert nach Smith et al. (2011) und Kocot et al. (2011).

Die Anpassungen an unterschiedliche Habitate erforderte im Laufe der Evolution physiologische Adaptationen, z.B. der Osmoregulation (Robertson et al. 1964; Deaton et al. 1989), der Temperaturanpassung (Segal 1961; Hoffmann 1983), an unterschiedliche Vorkommen von Schwermetallen (Beil et al. 2019; Calatayud et al. 2021) und an die Sauerstoffverfügbarkeit (Brix et al. 1989). Ein Aspekt der Anpassung an die Sauerstoffverfügbarkeit ist die Evolution eines

respiratorischen Proteins für den Sauerstofftransport im Organismus. Viele Mollusken verfügen über Hämocyanin als respiratorisches Protein, welches auch in Arthropoden weitverbreitet ist. Für einen Überblick siehe Decker und Terwilliger (2000), Burmester (2001) und Markl und Decker (1992). Beide Hämocyanine unterscheiden sich in der Struktur und haben sich wahrscheinlich unabhängig voneinander entwickelt (Burmester 2001; Aguilera et al. 2013). Im Hinblick auf die in meiner Arbeit betrachteten Hämocyanine der Mollusken siehe für einen Überblick Terwilliger (1998b), Chiumiento et al. (2020), van Holde und Miller (1995), Decker et al. (2007) Kato et al. (2018). Im Phylum Mollusca gibt es kein ubiquitäres respiratorisches Protein, die Variationsbreite reicht von: keinem Sauerstofftransportprotein (PONDER et al. 2020), Hämocyanin (Lieb et al. 2001; Kato et al. 2018), Hämoglobin (Decker et al. 2014; Wang et al. 2020; Bao et al. 2021), oftmals Myoglobin in den Muskeln (Decker et al. 2014; Bao et al. 2021) bis Hämerythrin (Costa-Paiva et al. 2017). Die vorgenannten respiratorischen Proteine unterscheiden sich in ihrer Sauerstoffbindungskapazität und -Affinität, was eine Anpassung an den andersgearteten Sauerstoffbedarf in den Mollusken-Spezies darstellt, da das Spektrum der Lebensweise der Mollusken von sessil bis vagil und die Ernährungsweise von Destruenten bis Prädatoren reicht (Hammen 1980; Vosloo et al. 2013).

Ein Fokus meiner Arbeit lag auf den jüngst entdeckten Peltospiridae-Gastropoden *Chrysomallon squamiferum* (Chen et al. 2015c) und *Gigantopelta aegis* (Chen et al. 2015d).

Beide Peltospiridae leben in der Tiefsee in der Umgebung von hydrothermalen Quellen im Indischen Ozean und bilden dort große Gemeinschaften, wobei sie sich das Habitat mit etwa 37 anderen Taxa teilen (Watanabe und Beedessee 2015). Diese „Hot vent“ Tiefsee-Spezies haben sich an die dort herrschenden hohen Wassertemperatur und -Druck (100 atm bei 1000 m Tiefe) (van Dover 2000), Schwermetallvorkommen und an unterschiedlichen Sauerstoff- und Schwefelgehalt angepasst (van Dover et al. 2001; Hundahl et al. 2003; Vosloo et al. 2013; Tao et al. 2014; Chen et al. 2015d). Diese beiden Gastropoden-Arten haben gemein, dass ihre Habitus größer sind als zu erwarten wäre und morphologische Eigenarten aufweisen, die sie von anderen Gastropoden unterscheiden (van Dover 2000; Warén et al. 2003; Chen et al. 2015d). Diese Unterschiede könnten ein Hinweis darauf sein, dass auch die Respiration Anpassungen an diesen sehr speziellen Lebensraum aufweist. Aufgrund der bereits bekannten Hämocyanin-Strukturen besteht die Möglichkeit, dass in diesen Spezies weitere Hämocyanin-Typen identifiziert werden können.

Die bereits erwähnte Tatsache, dass nicht alle Mollusken Hämocyanine aufweisen, führte zur Überlegung, welche weiteren Sequenz-Daten sich zur Analyse im Hinblick auf Adaptationen von Proteinen eignen könnten. Ferritin als ubiquitäres Protein schien ein guter Kandidat zu sein, um Sequenz-Daten aller Mollusken-Klassen in die Untersuchung einzuschließen. Ferritin hat in

Mollusken, zusätzlich zur Eisenspeicherung, wie sie in allen Organismen notwendig ist, eine besondere Bedeutung, da die exklusiv in Mollusken vorkommenden Radula-Zähne teilweise mit Eisenbestandteilen gebildet werden (Towe et al. 1963; Ernisse und Reynolds 1994) oder es kann bei der Schalenbildung involviert sein (Zhang et al. 2003).

Der Grundgedanke meiner Arbeit war, dass Transkriptome Hinweise auf Anpassungen an (extrem) Habitats und die Plastizität der jeweiligen Gene geben können (Kelley et al. 2016; Kenkel und Matz 2016). Die daraus resultierenden Fähigkeiten zur Anpassung an wechselnde Lebensbedingungen, wie sie sich zum Beispiel aus dem Klimawandel ergeben, wurden in zahlreichen Publikationen erörtert, Beispiele siehe hier: Evans und Hofmann 2012; Alvarez et al. 2015; DeBiasse und Kelly 2016; Oomen und Hutchings 2017; García-Souto et al. 2024.

Ich setzte mir das Ziel, Transkriptom-Sequenzen möglichst vieler Mollusken-Familien auf respiratorische Proteine zu untersuchen, denn eine so umfassende Analyse der respiratorischen Proteine über alle Mollusken-Klassen hinweg wurde noch nicht durchgeführt. Aus den untersuchten Transkriptom-Daten sollten nachfolgend die Hämocyanin- und Ferritin-Sequenzen assembliert werden. Die neu assemblierten Sequenzen ergänzten die bereits publizierten Transkriptom-Sequenzen in der molekularphylogenetischen Analyse, um der Frage nach der Evolution der Hämocyanin-Gene nachzugehen.

Zur Einleitung in die Thematik stelle ich im Folgenden zuerst die einzelnen Mollusken-Klassen, beginnend mit den artenreichsten Klassen vor, gefolgt von einer kurzen Einführung in die Hämocyanine und Ferritine.

1.1. Mollusken Klassen

Gastropoden

Diese Klasse der Mollusken besiedelt alle Klimazonen der Erde (W.O.R.M.S; Barker 2001; Pearce und Örstan 2006; Tripathy et al. 2018). Die geschätzte Anzahl der Arten schwankt je nach Autor stark (32.000-90.000) (Barker 2001; Aktipis et al. 2008; Appeltans et al. 2012; Ponder 2019). Die Phylogenie der Gastropoden unterliegt mit fortschreitendem Wissen immer wieder Revisionen (Haszprunar 1988; Bouchet und Rocroi 2005; Grande et al. 2008; Aktipis und Giribet 2010; Bouchet et al. 2017). Zurzeit sind die Gastropoden in sechs Subklassen eingeteilt. Die artenreichsten Subklassen sind die Caenogastropoda und Heterobranchia, die mit der Subklasse Neritimorpha alle Habitats von marin bis terrestrisch bewohnen. Die weiteren Unterklassen sind Vetigastropoden (aquatisch lebend), Patellogastropoda, Neomphaliones und Prosobranchia, die

alle rein marin leben (W.O.R.M.S). Es werden auch heute immer noch Mollusken-Arten entdeckt und benannt, basierend auf Schalenanalysen in Museumssammlungen (Healy 2021), neuen phylogenetischen Erkenntnissen (Barord et al. 2023) oder bei der Exploration von unzugänglichen Regionen, wie der Tiefsee (Chen et al. 2015c; Lin et al. 2023). Seit jeher spielten Schnecken eine wichtige Rolle im Leben der Menschen, früher dienten sie vorwiegend als Nahrungsmittel, Dekoration oder zur Farbstoffgewinnung (Melzer et al. 2001; Händel 2015; Ab Lah et al. 2017), heute sind sie ebenso relevant in der Werkstoff-Forschung (Götze und Göbbels 2017), in der Medizin z.B. als Krebsmedikament (Olsson et al. 1974; Benkendorff 2010; Gesheva et al. 2011; Dang et al. 2015; Gesheva et al. 2015), in der Schmerztherapie (Safavi-Hemami et al. 2019; Layer und McIntosh 2006) und in der Kosmetikindustrie (Mucus als Zusatz in Cremes (Liudmyla et al. 2022; Deng et al. 2023)). Beispiele für die kommerzielle Vermarktung von Gastropoden-Hämocyaninen sind KLH (*Megathura crenulata*) von u.a. Sigma-Aldrich® und biosyn® zur Impfstoffherstellung oder als Antigen und *Fissurella latimarginata* Hämocyanin in der Medizinforschung ((für die Entwicklung neuer Impfstoffe, Krebstherapien (Arancibia et al. 2014)). Auf der anderen Seite gibt es Gastropoden, die schwerwiegende Schäden, nicht nur (land-)wirtschaftlich (wie *Pomacea*), verursachen, denn einige Arten dienen als Zwischenwirte für Parasiten, die verheerende Krankheiten beim Menschen auslösen können, wie die Bilharziose (Han et al. 2009; WHO) oder Fasziole (WHO).

Gastropoden sind zwischen 0,5 mm und 900 mm groß, und haben von einem „typischen“ Schneckenhaus bis hin zu einem gänzlich reduzierten Haus als Nacktschnecke ein weites Spektrum an Formen und Farben (PONDER et al. 2020) (für einige Beispiele siehe Abbildung 2).

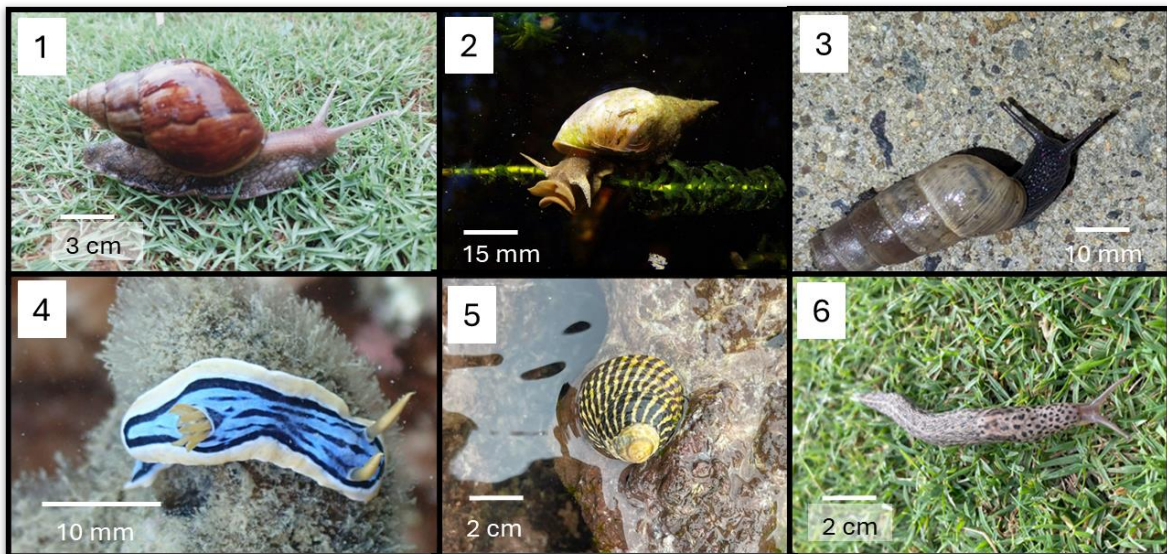


Abbildung 2: Beispiele der Gastropoden: **1) *Lissachatina fulica***, Francisco V. Bezerra Neto Publisher iNaturalist Record licence <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) References <https://www.inatu.../photos/344564374>, **2) *Lymnaea stagnalis*** https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Water_snail_Rex_2.jpg <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

org/licenses/by-nc/4.0/), **3) *Rumina decollata*** Kristin Sweeney, Publisher iNaturalist, Record licence <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) References <https://www.inatu.../photos/344582525>, **4) *Chromodoris elisabethina*, *afguemas*** Publisher iNaturalist Record licence <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) References <https://www.inatu.../photos/344041099>, **5) *Austrocochlea porcata***, smileynaomi Publisher iNaturalist Record <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>, References <https://www.inatu.../photos/343871482> **6) *Limax maximus***, alanawylie Publisher iNaturalist Record licence <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) References <https://www.inatu.../photos/343746801>

Im Laufe der Evolution der Gastropoden hat es zahlreiche Adaptationen an die unterschiedlichen Habitate gegeben, wie die mehrmalige Anpassung an ein Leben an Land (Schäfer et al. 2019) und die damit einhergehende Entwicklung von Lungen beispielhaft zeigt (Schäfer et al. 2019; Ayyagari und Sreerama 2020; Krug et al. 2022). Im Hinblick auf Hämocyanine als Sauerstofftransporter ist es wichtig zu beachten, dass die Verfügbarkeit von Sauerstoff für den Organismus Schwankungen unterliegt, zwischen den Habitaten und innerhalb eines Habitats abhängig vom umgebenden Medium, der Temperatur, dem Druck und dem pH-Wert (Penzlin 2005). Deshalb erfolgte neben der physiologischen Anpassung an verschiedenste Habitate auch die Entwicklung verschiedener Lebensweisen und Ernährungsformen. Diese Differenziertheit zeigt sich z.B. in der Ernährungsweise: von herbivor, karnivor, detritivor, parasitär bis hin zu symbiontisch.

Zwei besondere Schneckenarten, die mit Endosymbionten in der Tiefsee leben, wurden im Zuge der Erforschung der Tiefsee im Indischen Ozean an den Rändern von tektonischen Platten bei Expeditionen in den frühen 2000er Jahren entdeckt (van Dover et al. 2001; van Dover et al. 2002; Copley et al. 2016) und wurden von mir im Hinblick auf ein mögliches Vorkommen von Hämocyanin untersucht. Es handelte sich hierbei um Vertreter der Ordnung *Neomphalida*, zum einen *C. squamiferum*, auch „scaly foot snail“ genannt (van Dover 2000; Warén et al. 2003), und eine weitere Vertreterin dieser Ordnung *Gigantopelta aegis* (van Dover 2000; Chen et al. 2015d) (Abbildung 3).

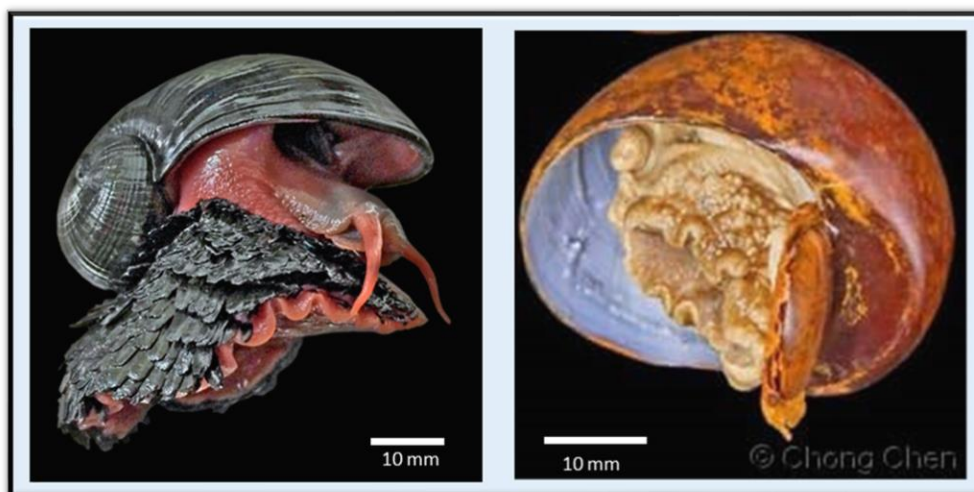


Abbildung 3: Peltospiridae Spezies *Chrysomallon squamiferum* links (persönliche Überlassung von Chong Chen) und *Gigantopelta aegis* rechts Zool. J. Linnaean Soc. - Vol. 175, p 327,

Diese beiden Spezies leben in der Tiefsee im indischen Ozean an heißen Schloten mit unterschiedlichem Gehalt von unter anderem Eisen und Schwefel (Warén et al. 2003; Chen et al. 2015d; Kawagucci et al. 2016; Sun et al. 2020b) und haben eine ähnliche Größe mit ca. 4,5 cm. Sowohl der Habitus unterscheidet sich durch die bei *C. squamiferum* einzigartigen Skleriten (Warén et al. 2003; Goffredi et al. 2004; Yao et al. 2010; Chen et al. 2015a; Okada et al. 2019), als auch die unterschiedliche Endosymbionten-Spezies in der hypertrophierten Oesophagus Drüse (Lan et al. 2021; Lan et al. 2022). Beide Arten gehören nach heutiger Auffassung zu der Familie Peltospiridae (Chen et al. 2015d). In dieser Biozönose wurden zwei weitere kleinere Gastropoden identifiziert, *Dracogyra subfusca* (Chen et al. 2017b) und *Lirapex politus* (Chen et al. 2017b), welche keine Endosymbionten wie *C. squamiferum* und *G.aegis* aufweisen. Aufgrund der außergewöhnlichen Morphologie und der Datenlage fokussierte ich mich in meiner Arbeit auf die beiden erstgenannten Peltospiridae, um deren respiratorische Proteine zu untersuchen.

Bivalvia

Die Klasse der Bivalvia spielt wie die Gastropoden eine wichtige wirtschaftliche Rolle. Muscheln werden ebenso weltweit als Nahrungsmittel genutzt und ihre Schalen als Schmuck oder zu Dekorationszwecken verwendet (Marean et al. 2007; Gosling 2015). In der Vergangenheit waren Muschelschalen in vielen Kulturen ein verbreitetes Zahlungsmittel (Petri 1936). Neben den vorgenannten Gastropoden-Schädlingen sind auch einige Muschel-Arten Schadorganismen, wie zum Beispiel der als Holzschädling bekannte Schiffswurm (Teredinidae) (Bartsch 1922). Die Bivalvia werden in zwei Unterklassen unterteilt, die unterschiedlich spezieereich sind. Neben Autobranchia (ca. 7.700 Arten (W.O.R.M.S)) werden Protobranchia (leben ausschließlich marin, 739 Arten (W.O.R.M.S)) unterschieden. Muscheln leben ausschließlich aquatisch (marin, limnisch oder im Brackwasser), wobei sich ihre Lebensräume meist bis zu einer Wassertiefe von 100 m, selten bis in die Tiefsee erstrecken. Die Schalen von Adulten kann zwischen 0,5 mm bis 1,4 m lang sein, wobei eine Schalenhälfte bis zu 115 kg wiegen kann (Ponder 2019).

Der zweischalige Habitus der verschiedenen Spezies reicht von symmetrisch bis zu asymmetrisch, gelegentlich auch röhrenförmig, jedoch immer ohne differenzierten Kopf. Muscheln können in ihrem natürlichen Habitat bisweilen viel farbenfroher sein, als die Schalen es vermuten lassen und einige Beispiele sind in Abbildung 4 dargestellt. In Hinsicht auf die respiratorischen Proteine ließ sich nur in der Subklasse Protobranchia Hämocyanin nachweisen (Toulmond et al. 1987; Mangum et al. 1987; Herskovits et al. 1990), wohingegen in Arcida (Grinich und Terwilliger 1980) und einigen Archaeoheterodonten Hämoglobin in der Hämolymphe gefunden wurde (Read 1962).

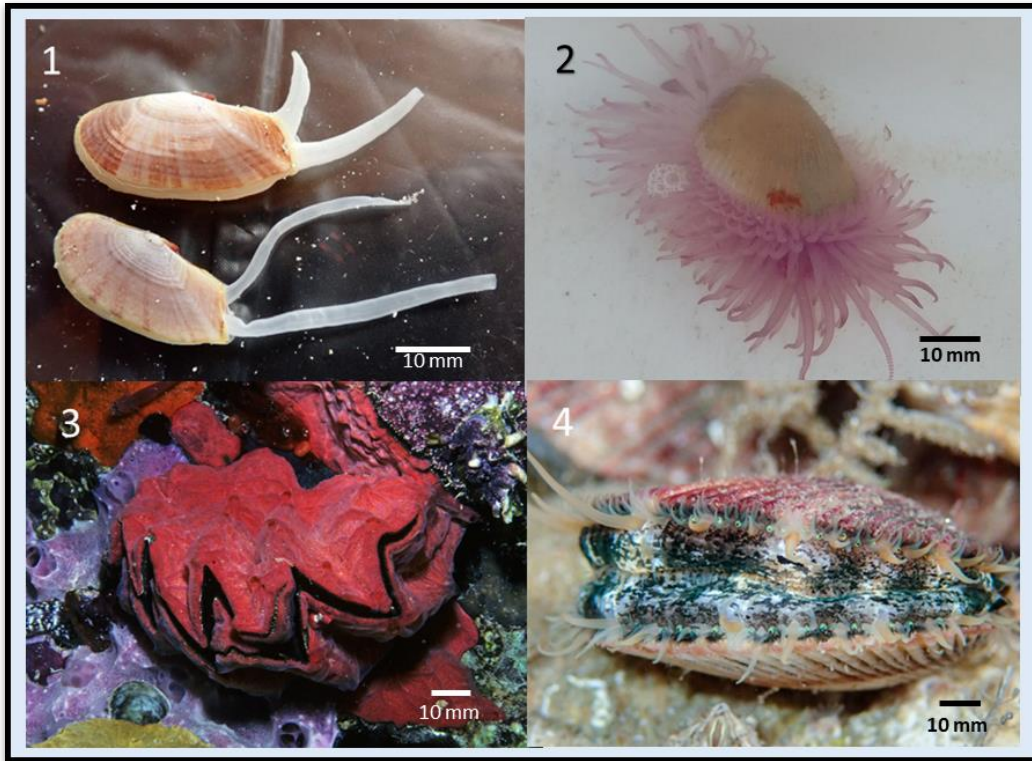


Abbildung 4: Verschiedene Vertreter der Bivalvia: 1) *Gari fervensis* (Gmelin, 1791) Frans Slieker, (W.O.R.M.S), 2) *Limaria tuberculata* (Olivi, 1792), El Bouchikhi, Khadija, (W.O.R.M.S), 3) *Lopha cristagalli* (Linnaeus, 1758) Paulay, Gustav (W.O.R.M.S), 4) *Chlamys islandica* (O. F. Müller, 1776) Nozères, Claude, alle unter Lizenz <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Caudofoveata

Caudofoveata werden zusammen mit den Solenogastren als Aplacophora, also Schalenlose, bezeichnet. Beide Klassen haben gemein, dass der Körper schalenlos, wurmartig und mit einer Cuticula ausgestattet ist (Abbildung 5). Caudofoveata sind Microomnivoren (Scheltema und Ivanov 2009), sie ernähren sich also von Detritus und Foraminiferen (Todt et al. 2008). Sie vergraben sich mit Hilfe ihres oralen Schilds, wobei der posteriore Köperteil mit den Kiemen aus dem Sediment ragt. Sie sind 0,3 bis 14 cm groß und im Gegensatz zu den Solenogastren hauptsächlich auf der Nordhalbkugel zu finden. Sie bevorzugen Tiefen zwischen 30 m und der Tiefsee bis 7.300 m, wie die Scaphopoda (Scheltema und Ivanov 2009). Zur Zeit gibt es Anhaltspunkte dafür, dass diese Klasse über Hämocyanine verfügt (Lieb und Todt 2008).



Abbildung 5: Ein Vertreter der Caudofoveata ist *Chaetoderma nitidulum* (Lovén, 1844), mit den typischen Scleriten auf der Körperoberfläche, die wie ein Fell aussehen können (W.O.R.M.S) Lizenz <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Cephalopoden

Eine für ihre außergewöhnlichen Fähigkeiten und ihre herausragende Intelligenz gerühmte Mollusken-Klasse sind die Cephalopoden (Nixon und Young 2011, 2003; Mather 2008). Mit ca. 840 rezenten Arten sind sie weniger artenreich, wie die Gastropoden und Bivalvia (W.O.R.M.S), ihre Körpergröße variiert zwischen wenigen Zentimetern bis hin zu dem sagenumwobenen Riesenkalmar mit bis zu 13 m Länge (einige Vertreter der Cephalopoden sind in Abbildung 6 dargestellt) (Roper und Shea 2013). Die Cephalopoden leben ausschließlich marin und ernähren sich überwiegend karnivor. Als Anpassung an diese Nahrungsaufnahme verfügen sie über einen bei Mollusken einzigartig umgebildeten Kiefer, den sogenannten Schnabel. Zum Genus *Sepia* gehörende Spezies können nicht nur ihre Körperfarbe, sondern auch ihre Oberflächenstruktur beliebig in Sekundenschnelle anpassen (Hanlon, R. T. and Messenger, J. B. 1988; Cloney und BROCCO 1983). Cephalopoden werden, ebenso wie Bivalvia, in zwei Subklassen unterteilt, in Nautiloidea und Coleoidea. Nautiloidea haben eine typische gekammerte Schale, die bei Coleoidea fehlt (sie liegt reduziert im Mantel oder ist vollständig reduziert). Im Gegensatz zu den anderen Klassen der Mollusken bewegen sich Cephalopoden mit Hilfe des Rückstoßprinzips und Flossenbewegung fort und können sich schnell fortbewegen (Webber et al. 2000; Truemen 1983).

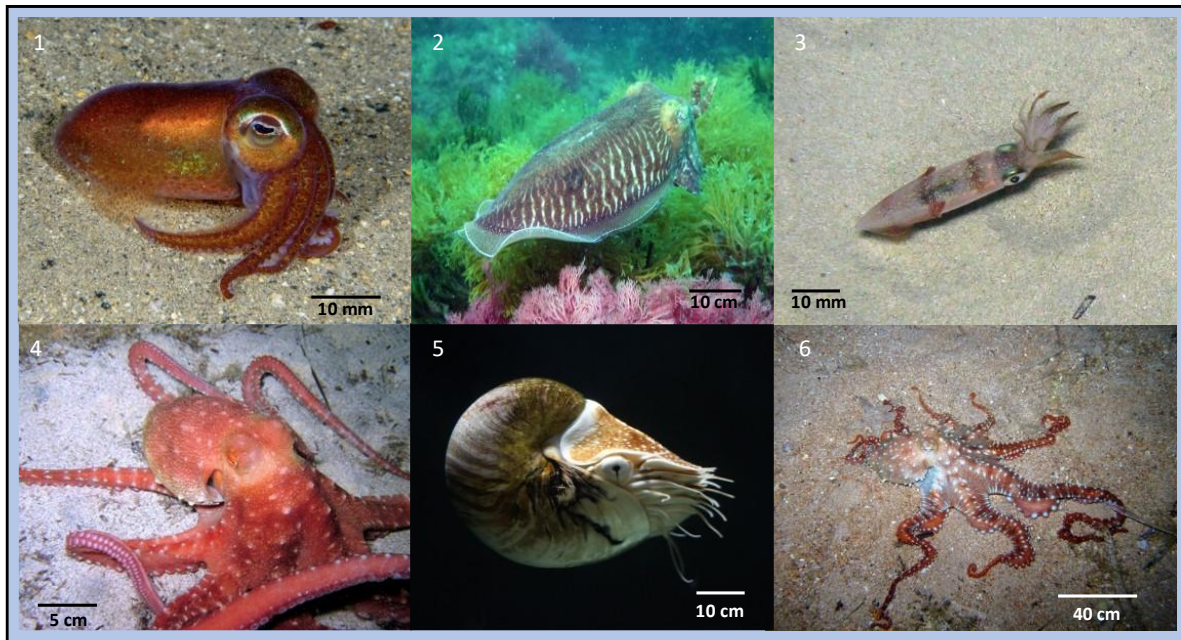


Abbildung 6: Übersicht von Vertretern der Cephalopoden: **1) *Rossia macrosoma***, Picton, Bernard (W.O.R.M.S), **2) *Sepia officinalis***, Rosier, Gaynor, (W.O.R.M.S) **3) *Loligo vulgaris***, Pillon, Roberto (W.O.R.M.S), **4) *Callistoctopus macropus*** Pillon, Roberto (W.O.R.M.S), **5) *Nautilus pompilius***, Hillewaert, Hans (W.O.R.M.S), **6) *Callistoctopus macropus***, Pillon, Roberto, (W.O.R.M.S), alle unter Lizenz <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Die Vertreter dieser Klasse leben im Gegensatz zu den vorgenannten Gastropoden und Bivalvia meist pelagisch oder benthisch. Ihre Lebensweise stellt andere Anforderungen an die Physiologie als bei Gastropoden und Muscheln, Nährstoffe und Sauerstoff müssen effektiver für den erhöhten Bedarf bei schneller Lokomotion zur Verfügung gestellt werden, was durch Anpassungen des Nerven- und Vaskularsystems erfolgte (Webber et al. 2000). Der erhöhte Sauerstoffbedarf wird teilweise über Anpassungen des Hämocyanins gedeckt (Oellermann et al. 2015; Brix et al. 1989).

Monoplacophora

Monoplacophoren haben, wie der Name bereits beschreibt, nur eine Schale. Dieser Klasse werden 30 rezente Arten zugeordnet (W.O.R.M.S). Sie galten lange als ausgestorben bis 1957 die Entdeckung eines Exemplars bei einer Tiefsee-Expedition gelang (Lemche 1957). Typischerweise leben die Vertreter dieser Klasse in der Tiefsee (177 m bis über 6.000 tief) (Wilson et al. 2009; Rosewater 1970) und die Schalen sind oft weiß oder farblos und meist nur wenige Millimeter lang (Haszprunar 2008). Diese Eigenschaften erschweren die Erforschung, die Bestimmung und die Gewinnung von Proben. Nachweise für Hämocyanine in dieser Klasse sind bis jetzt noch nicht erbracht worden.

Polyplacophora

Polyplacophoren, oder auch Chitone genannt, leben ebenfalls ausschließlich marin. Kennzeichnend sind die acht Schalenplatten, die von einem Gürtel eingefasst werden. Dieser Gürtel kann Scleriten aufweisen, und die Schalenplatten können von Aestheten durchbrochen sein (Todt et al. 2008). Ihre Lebensweise ist benthisch, meist leben sie in der Brandungszone, manche Arten findet man aber auch in der Tiefsee (Kaas et al. 2006; Schwabe 2008; Sigwart et al. 2010). Die Körpergröße der Polyplacophoren reicht von wenigen Zentimetern bis zu dem größten Vertreter *Cryptochiton stelleri* mit bis zu 36 cm Länge (PONDER et al. 2020). Ihr Körperbau weist einen Fuß auf mit dem sie sich am Substrat festsaugen können. Die einzigartig gegliederte Schale lässt es zu, dass sie sich bei Gefahr zusammenrollen. Meist leben sie als Weidegänger, aber auch andere Ernährungsformen wie detritophag, karnivor, spongivor und andere kommen vor (PONDER et al. 2020). Einige Vertreter dieser Klasse sind in Abbildung 7 gezeigt. Über die Hämocyanine dieser Klasse ist nur wenig bekannt, zurzeit ist keine vollständige Hämocyaninsequenz in NCBI hinterlegt.

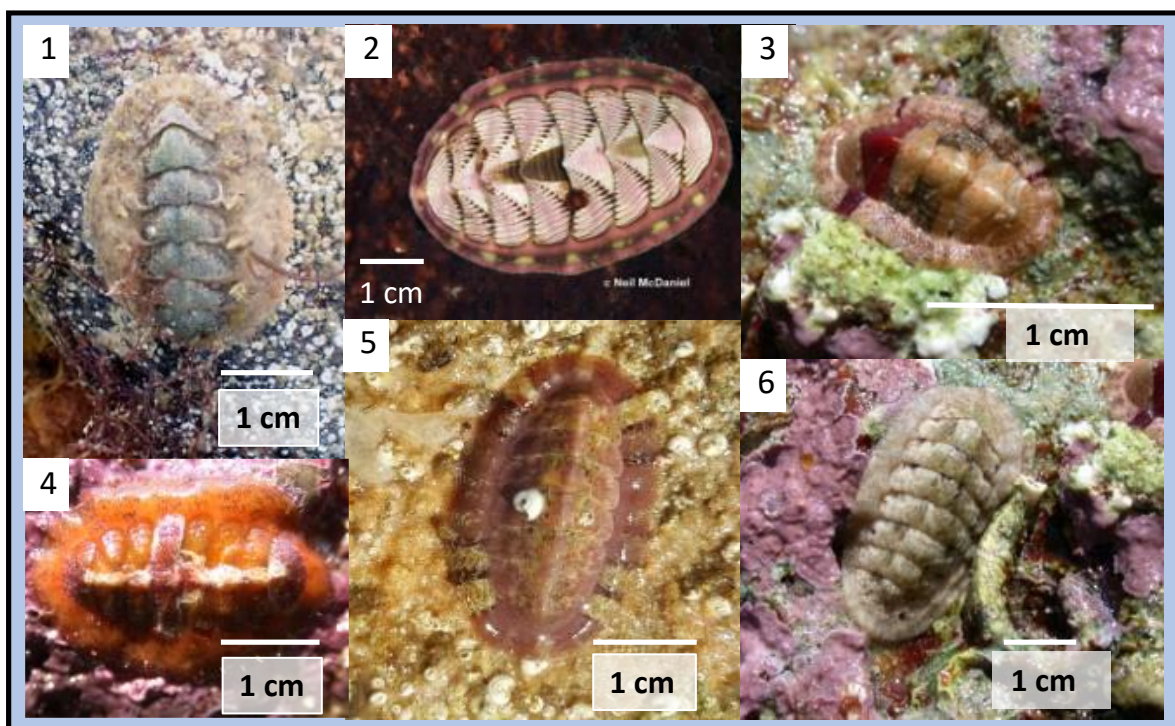


Abbildung 7: Verschiedene Polyplacophoren in ihren Habitaten: 1) *Acanthochitona fascicularis*, 2) *Tonicella lineata*, 3) *Rhyssoplax corallina*, 4) *Callochiton septemvalvis*, 5) *Callochiton septemvalvis*, 6) *Ischnochiton rissoi*, alle Bilder aus (W.O.R.M.S) nach der Lizenz <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Scaphopoda

Scaphopoda oder Kahnfüßer leben marin und gleichen der Erscheinung nach einer Röhre oder einem Stoßzahn, wie die englische Bezeichnung *tusk shell* beschreibt (Abbildung 8). Die Röhre

dieser Tiere wird maximal 15 cm lang. Sie graben sich in den Boden ein, und nur der reduzierte Kopf mit den *Captacula* ragt heraus. Ihr Lebensraum erstreckt sich bis in eine Tiefe von ca. 6.000 m, selten leben sie intertidal (Ponder 2019). Die Scaphopoda werden in die Ordnung Dentaliida und Gadilida, die beide ähnlich artenreich sind, eingeteilt (insgesamt 577 Arten (W.O.R.M.S)). Die Gehäuse dienen ebenfalls oft als Schmuckelemente oder wurden auch als Muschelgeld genutzt (Erlandson et al. 2005; Clark 1963). Es liegen keine Bestätigungen für Hämocyanin als respiratorisches Protein in dieser Klasse vor (Reynolds 2002; Lieb und Todt 2008).



Abbildung 8: Die Schale von *Graptacme calamus*, (W.O.R.M.S) Lizenz <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Solenogastres

Solenogastres werden auch Furchenfüßer genannt. Sie leben ebenfalls ausschließlich marin, sind schalenlos und meist sehr klein, nur wenige Arten werden bis zu 30 cm groß (PONDER et al. 2020). Sie leben in Tiefen bis ca. 4.000 m in allen Ozeanen, sind aber hauptsächlich auf der südlichen Halbkugel zu finden (García-Álvarez et al. 2000). Ihre Körper haben eine harte Haut, die *Cuticula*, die mit *Spiculi* bedeckt ist, die wie ein Fell aussehen können (siehe Abbildung 9). Sie sind oft auf Korallen zu finden von denen sie sich ernähren. Der Körper ist wenig differenziert, der Kopf ist lediglich durch den Mund zu erkennen und sie haben eine namensgebende Furche auf der ventralen Körperseite. Auch diese Klasse weist nach heutigem Kenntnisstand kein Hämocyanin auf (Lieb und Todt 2008).

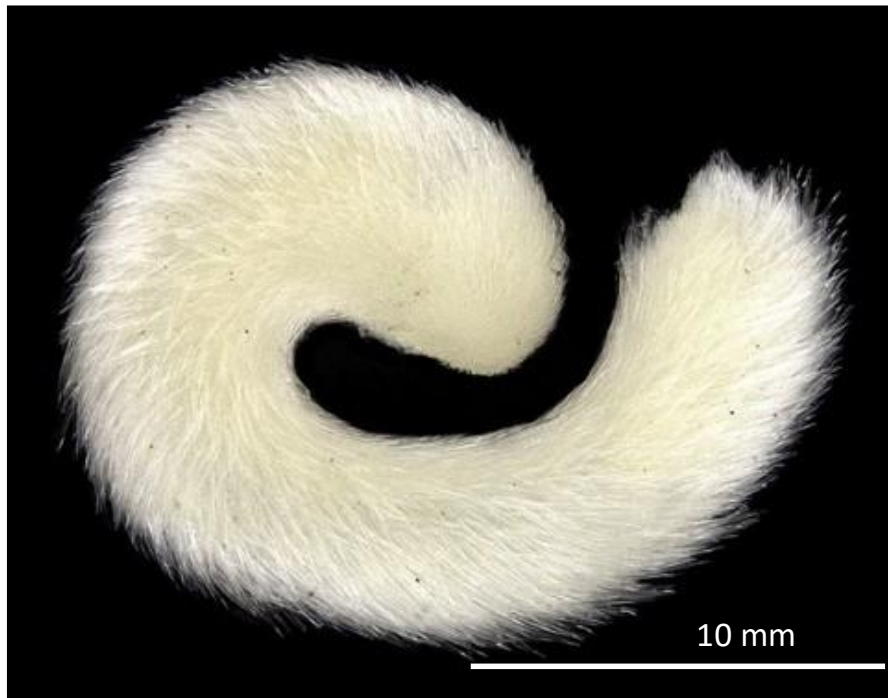


Abbildung 9: Der Vertreter der Solenogastren *Amboherpia heterotecta* Handl & Salvini-Plawen, 2002, mit seinen hellen Spiculi, die wie Haare wirken. Quelle: Wikipedia, Lizenz siehe <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

1.2. Struktur des Hämocyanins

Für das Phylum Mollusca, wie auch für die Arthropoden, wird das Hämocyanin verallgemeinernd als respiratorisches Protein, der sogenannte Blutfarbstoff angeführt. In beiden Fällen dieser Hämocyanine binden Sauerstoffmoleküle im aktiven Zentrum an Kupferionen und die Proteine flotieren frei in der Hämolymphe, wogegen sich die 3D-Struktur der Hämocyanine der beiden Phyla grundsätzlich unterscheidet. Für einen Überblick siehe van Holde und Miller 1995; Markl und Decker 1992; van Holde und Miller 1982; Bonaventura et al. 1981. Das Hämocyanin der Mollusken ist ein großes Protein (3,3 bis 15,3 MDa) und wurde schon 1878 von Fredericq L. beschrieben. Weitere bekannte Blutfarbstoffe sind Hämoglobin und Hämyerthrin, welche Eisen im aktiven Zentrum aufweisen (York und Bearden 1970; Momenteau et al. 1976). Myoglobin, welches wie auch Hämoglobin zu den Häm-Proteinen gehört, ist ein muskuläres Sauerstoff-Speicherprotein und ist bekanntermaßen in vielen Tierstämmen zu finden (Tentori 1970). Hämocyanin hat neben der Sauerstofftransportfunktion auch eine wichtige Aufgabe in der angeborenen und humoralen Immunität der Mollusken (Dolashka-Angelova et al. 2009; Yao et al. 2019; Coates und Nairn 2014). Zudem wurde in *Sepia officinalis* nachgewiesen, dass Hämocyanin je nach Entwicklungsstadium

unterschiedlich exprimiert wird (Declair et al.; Streit et al. 2005; Yao et al. 2019) und zudem wurde in den Eiern und dem frühen Larvenstadium von *S. officinalis* eine dritte Hämocyanin-Isoform entdeckt (Thonig et al. 2014).

Mollusken-Hämocyanine waren schon Mittelpunkt vieler Studien und sind in der Literatur ausführlich diskutiert worden. Für einen Überblick siehe sich Decker und Terwilliger (2000), Markl (2013), Kato et al. (2018) und Coates und Costa-Paiva (2020). Die Struktur des Mollusken-Hämocyanins wird mit sieben oder acht „Funktionellen Einheiten“ (FU) angegeben und von FU a bis FU g bzw. FU h benannt (Lamy et al. 1987; Harris et al. 1993; Gebauer et al. 1999b; Lieb et al. 1999; Gebauer et al. 1999a; Gatsogiannis et al. 2007). Die einzelnen FUs sind zwischen ca. 400 bis 500 Aminosäuren lang und jede FU verfügt über ein aktives Zentrum, an dem ein Sauerstoffmolekül reversibel gebunden wird (Markl 2013; Kato et al. 2018). Die globulären FUs werden, wie eine Kette mit durch Linkerpeptide verbundene Perlen, zu Monomeren (bestehen aus ca. 3400 Aminosäuren (Lieb et al. 2000; Altenhein et al. 2002; Lieb et al. 2004)) assembliert, die wiederum zu Dekameren, Didekameren oder Multidekameren assoziieren (Herskovits und Hamilton 1987; Miller et al. 1990; van Holde et al. 1991; Bonafe et al. 1994; Harris et al. 2004; Markl 2013; Gatsogiannis et al. 2015). Ein Dekamer bildet aus zehn Monomeren die Form eines Zylinders, der von einem sogenannten Kragen an einer Seite umgeben wird. Der Zylinder kann mehr oder weniger gefüllt sein, ein Beispiel für eine 3D Kristall-Struktur siehe Abbildung 10 (Bergmann et al. 2006; Lieb et al. 2010; Gai et al. 2015; Matsuno et al. 2015).

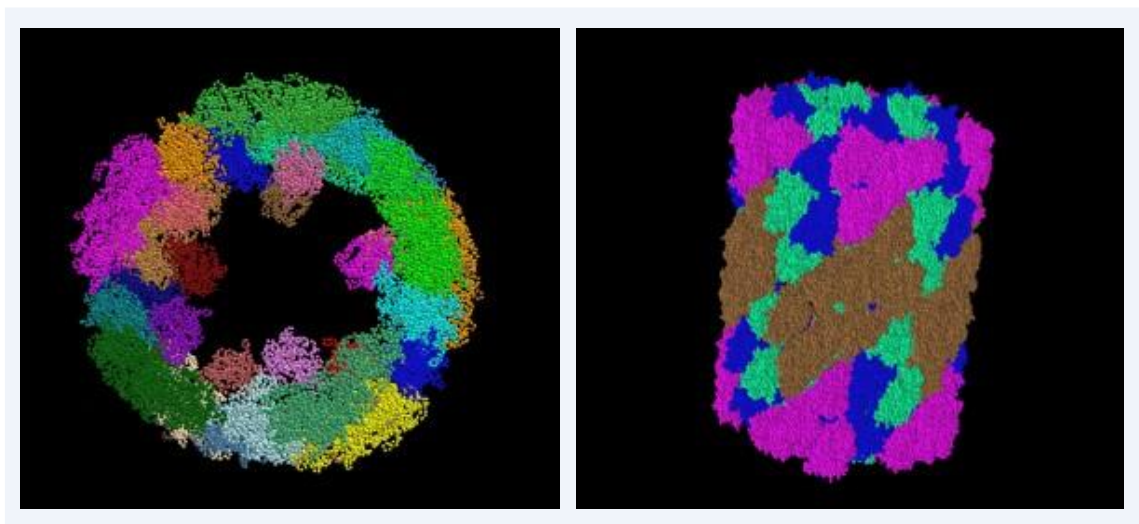


Abbildung 10: links: PDB ID 4YD9: Kristallstruktur des Hämocyanins von *Todarodes pacificus* (Matsuno et al. 2015), rechts: PDB-ID 4BED: Keyhole limpet Hämocyanin (KLH): 9A cryoEM Struktur und molekulares Model von KLH1 Didekamer, welches die Schnittstellen und die komplizierte Topologie der 160 Funktionseinheiten darstellt.

Im Grundsatz lassen sich heute die vier nachfolgend dargestellten Hämocyanin-Typen unterscheiden (Abbildung 11), wobei die Farben für die paralogen FUs stehen und die schwarzen

Balken die Linkerpeptide zwischen den FUs repräsentieren. Die Linkerpeptide sind zwischen 10 und 20 Aminosäuren lang und liegen up- und downstream von den Linker Introns, die die Exons verbinden (Ioannes et al. 2004; Gatsogiannis et al. 2007). Es wird der Squid-Typ mit der Duplikation der FU-d (Sepiidae), der Nautilus-Typ mit sieben FUs (Miller et al. 1990; Bergmann et al. 2006; Gatsogiannis et al. 2007; Markl 2013), der Megahämocyanin-Typ mit insgesamt sieben FU fs (Schäfer et al. 2021a) und der Keyhole limpet Typ mit acht FUs (Harris et al. 1993; Gebauer et al. 1999a; Kato et al. 2018) unterschieden.

Funktionale Einheiten (FU)

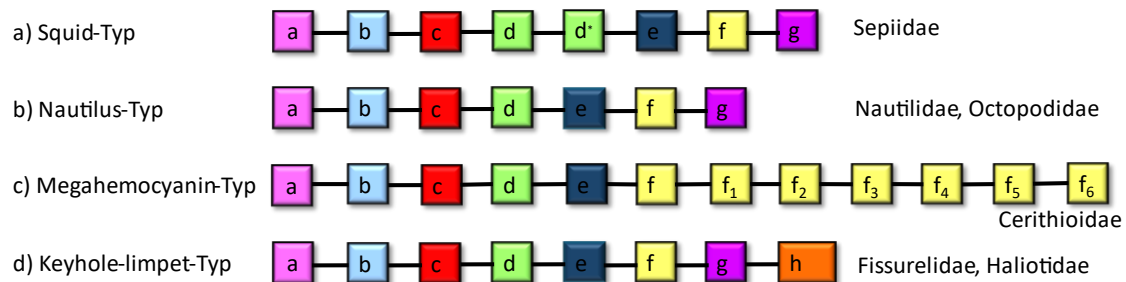


Abbildung 11: Schematische Darstellung der „Funktionellen Einheiten“ (FU) der bisher bekannten Hämocyanin-Typen: Squid-Typ (Sepiidae), Nautilus-Typ in Nautilidae und Octopodidae (Bergmann et al. 2006; Gatsogiannis et al. 2007; Markl 2013; Miller et al. 1998; Lamy et al. 1987, Megahämocyanin-Typ (Cerithioidae) (Schäfer et al. 2021a; Lieb et al. 2010) und Keyhole limpet-Typ (Fissurelidae und Haliotidae) adaptiert nach (Kato et al. 2018; Gebauer et al. 1999a). Die Farben repräsentieren die jeweiligen FUs, die schwarzen Striche symbolisieren die Linkerpeptide, die die einzelnen FUs verbinden.

Der Fokus meiner Arbeit liegt auf der Analyse von Transkriptom-Sequenzen, welche keine gesicherten Aussagen über die Art der Dekamer-Bildung zulassen, demzufolge begrenze ich hier die Ausführungen zur Struktur der Hämocyanine.

1.3. Genstruktur von Hämocyaninen

Die Genstruktur spiegelt sich im Aufbau des Proteins aus diskreten FUs, die durch kurze Linkerpeptide verbunden sind, wider (Altenhein et al. 2002). Beginnend mit einem Signalpeptid reihen sich die FUs kodierte durch mit Linkerpeptiden und internen Introns verbundene Exons aneinander (Lieb et al. 2001; Lieb et al. 2004; Altenhein et al. 2002; Bergmann et al. 2006). Innerhalb der Exons können sich mehrere interne Introns, die für das jeweilige Taxon spezifisch sind, befinden (Schäfer et al. 2021c; Altenhein et al. 2002; Bergmann et al. 2006; Lieb et al. 2001). Die Zahl der internen Introns variiert stark von wenige einzelne bis insgesamt über 50 interne Introns je Gen (Schäfer et al. 2021a; Lieb und Markl 2004). PONDER et al. (2020) führten aus, dass viele Mollusken über Hämocyanine verfügen, bei den Bivalvia ist dies lediglich von der Subklasse

der Protobranchien bekannt, Scaphopoden und Solenogastren haben nach heutigem Kenntnisstand keine respiratorischen Proteine (PONDER et al. 2020; Lieb und Todt 2008). Bei den Gastropoden ist Hämocyanin sehr verbreitet, wobei die Unterklasse Patellogastropoda kein Hämocyanin besitzt (Warnke et al. 2011). Für Caudofoveata wurden bereits Hinweise auf Hämocyanin gefunden (Lieb und Todt 2008).

Durch Sequenzvergleiche, wie mittels der Maximum Likelihood Methode, kann ermittelt werden, wie die Merkmale (Ranneby 1984; Pagel 1999), hier Hämocyanin-Gene, evolvierten. Nach Lieb et al. (2000) ist die ursprüngliche Hämocyaninsequenz aus FU-a bis FU-h aufgebaut, was sich dadurch zeigt, dass bei phylogenetischen Analysen der einzelnen FUs diese entsprechend zusammen einen Cluster bilden und es sich um orthologe Sequenzabschnitte handelt. Dies weist darauf hin, dass Hämocyanin vor der Diversifikation der Klassen vorhanden war und dass Duplikationen von Teilsequenzen, aber auch zu Sequenz-Verlusten im Lauf der Evolution stattfanden (Lieb et al. 2000).

Die Aussagekraft von Gensequenzen unterscheidet sich zu den Transkriptom-Sequenzen dadurch, dass die internen und Linker Introns durch Splicing aus der Prä-mRNA entfernt werden und somit nicht im fertigen Transkript enthalten sind. In der Betrachtung der Exon-Intron-Struktur der Gensequenzen, im Vergleich zur Proteinsequenz, erhält man somit Auskunft über die Anzahl und Position der internen Introns, und im Vergleich mit weiteren Sequenzen kann so auf mögliche evolutionäre Ereignisse geschlossen werden (Schäfer et al. 2021c). Beispiele für repräsentative Exon-Intron-Sequenzen von Hämocyanin-Genen mit internen und Linker Introns sowie den FUs im bekannten Farbschema sind in Abbildung 12 dargestellt.

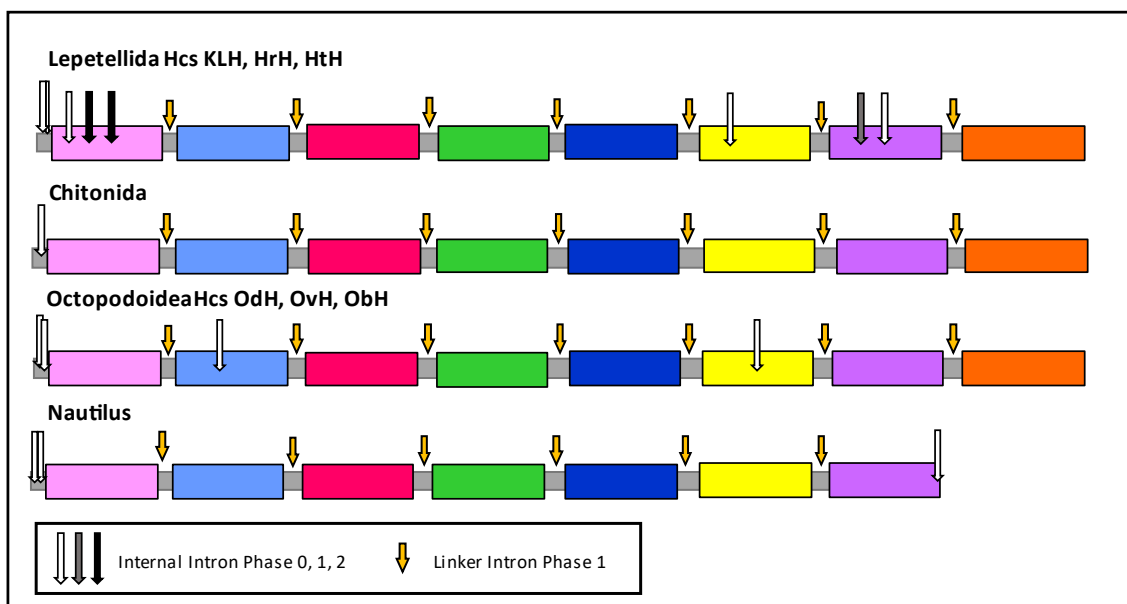


Abbildung 12: Schema repräsentativer Hämocyanin-Gensequenz (Hcs: Hämocyanine, KLH=keyhole limpet Hämocyanin, HrH= Haliotis rubra, HtH= Haliotis tuberculata Hämocyanin) mit dem Farbschema für die orthologen FUs und den internen Introns mit Pfeilen in weiß, grau und schwarz (Phase 0-2), Linker Introns sind in gelb dargestellt, nach Schäfer et al. 2021b).

1.4. Ferritin

Ferritin ist ein Eisenspeicher-Protein und ist ubiquitär in Tieren, Pflanzen und Bakterien verbreitet (Theil 1987). Es verhindert toxische Auswirkungen auf Zellen durch Bindung von Eisen und dient als Eisenspeicher, um Eisenreserven für den Organismus bereitzustellen (Kenneth M. Towe, H. A. Lowenstam and M. H. Nesson 1963; Wilbur und Hochachka 1983; Andrews et al. 1992). Die 3D-Struktur von Ferritin ist hochkonserviert, bestehend aus 24 Proteinuntereinheiten mit einem Durchmesser von ca. 12 nm (Chang et al. 2023; Theil 2011; Andrews et al. 1992). Es wurden mehrere verschiedene Untereinheiten gefunden, die sogenannte „Light-chain“ (L), die „Heavy-chain“ (H) (Theil 2011) und eine weitere Untereinheit, die „Middle-chain“ (M-chain) (Dickey et al. 1987). Die H-Kette besitzt, im Gegensatz zur L-Kette, ein dinukleares Ferroxidase-Zentrum, das für eine schnelle Eisen-Oxidation verantwortlich ist (Chasteen und Harrison 1999; Crichton und Declercq 2010; Harrison und Arosio 1996). Die Zusammensetzung von Ferritin aus L- und H-Untereinheiten in Vertebraten ist gewebespezifisch und unterscheidet sich in einem Organismus (Kenneth M. Towe, H. A. Lowenstam and M. H. Nesson 1963). Die M-Kette findet sich in niederen Vertebraten und diese besitzt Ferroxidase-Aktivität und eine Eisenspeicher-Eigenschaft (Giorgi et al. 2008). Für *Lymnaea stagnalis* wurde ein Soma- (X56778) und ein Dotter-Ferritin (X56779) nachgewiesen (Andrews et al. 1992). Die 24 Ferritin-Proteinuntereinheiten sind in einer 4-3-2-Symmetrie angeordnet, und die Untereinheiten bilden eine Schale in deren Hohlraum bis zu 4500 Fe(III)⁺ Atome als anorganische Komplexe aufgenommen werden können (Andrews et al. 1992). Die Untereinheiten sind als 4-Helix-Bündel mit einer 5. Helix, die im 60-Grad-Winkel zur Bündelachse steht, aufgebaut (Theil 1987) (Abbildung 13).

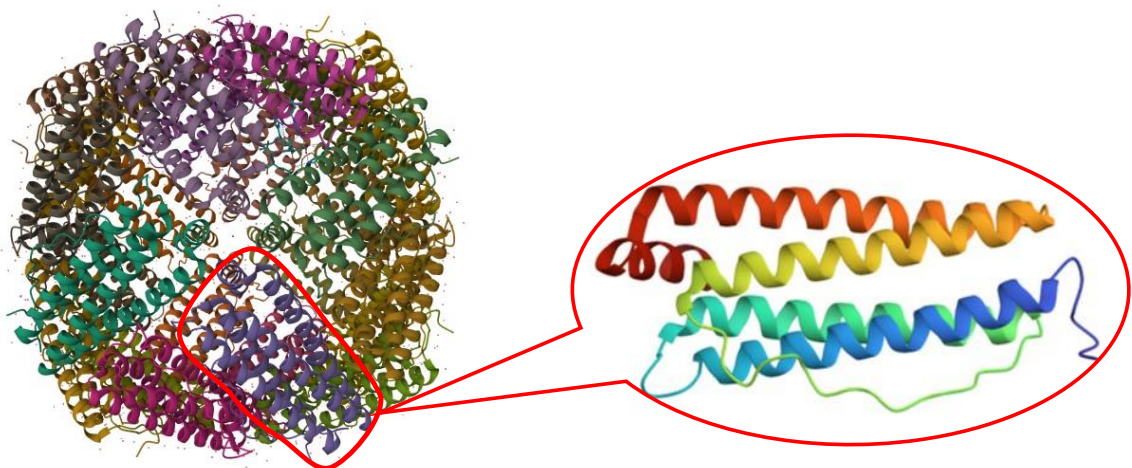


Abbildung 13: Mollusken-Ferritin in 3D-Darstellung (6LIJ, *Crassostrea gigas* ferritin) links und rechts ist ein Monomer mit den vier alpha-Helices (Li et al. 2020) (EC: 1.16.3.1) beispielhaft herausgestellt.

Die Notwendigkeit Eisen zu binden und für den Organismus verfügbar zu bevorraten, ist aufgrund der zum einen toxischen und zum anderen lebenswichtigen Eigenschaften des Eisens für nahezu alle Lebewesen wichtig, da Eisen in vielen aktiven Zentren von Enzymen und in Sauerstofftransportproteinen benötigt wird und somit unverzichtbar ist (Stern 1937; Patwardhan 1958; Frey und Reed 2012). Um diese verschiedenen Funktionen wie Speicherung und Bereitstellung von Eisen zu gewährleisten haben sich Ferritine mit unterschiedlichen Eigenschaften und Regulationsmechanismen entwickelt. Das Dotter-Ferritin von *L. stagnalis* besitzt eine 18 Aminosäure (AS) lange Leader-Sequenz für die Sekretion und ist unter Entwicklungskontrolle, wogegen das Soma-Ferritin nicht-sekretorisch ist und durch den intrazellulären Eisenlevel auf dem Translationsniveau reguliert wird (Andrews et al. 1992). Für die Regulation der Translation ist das 28 bp lange sogenannte Iron-Responsive Element (IRE) in der 5' UTR in den nicht-sekretorischen Ferritinen ausschlaggebend. Das IRE bildet einen „Loop“ aus 6 Basenpaaren (bp), namentlich CAGUGX, wobei X ≠ G ist und C sehr wichtig für die Funktion ist (La Coba de Peña et al. 2016).

Die Forschung zu Ferritinen in Mollusken hat hervorgebracht, dass für verschiedene Bivalvia bis zu vier Ferritine wie in *Mizuhopecten yessoensis* nachgewiesen wurden (Zhang et al. 2013), drei in *Argopecten irradians* (HQ225741.1, HQ225739.1, HQ225743.1, wobei Ferritin 1 und Ferritin 2 auch unter GU263464.1 und GU2634623.1 veröffentlicht wurden) und für *Ruditapes philippinarum* zwei Ferritine (KF017278.1, HQ174258). Auch für Gastropoden-Spezies sind mehrere Ferritine bekannt: für *Conus ebraeus* (KX963315, BK060471, BK060472), *Conus ermineus* (MH360399, MH360400), *Haliotis discus hannai* (DQ845482, GU479917, EU660052), und *Haliotis rufescens* (MH006612, MH006611). In Anbetracht der großen Artenvielfalt dieses Phylums ist das Wissen über Ferritine in Mollusken sehr gering.

Die beiden hier im Fokus stehenden Gastropoden *C. squamiferum* und *G. aegis* leben wie bereits erwähnt im Indischen Ozean in direkter Nähe zu heißen Schloten an den Rändern der dortigen tektonischen Platten und haben sich jeweils an die ganz spezifischen Gegebenheiten angepasst. Der Eisengehalt im „Kairei-vent field“ ist um das 58-fache höher als im „Solitaire-vent field“ (Sun et al. 2020a) und es stellt sich die Frage, ob durch die unterschiedliche Exposition von Eisen sich die Adaptation im Hinblick auf Ferritine feststellen lässt.

Besonders in eisenhaltigen Habitaten, wie sie an Schloten der Tiefsee vorkommen können, kann man davon ausgehen, dass Ferritin eine besonders wichtige Aufgabe zukommt (Liu et al. 2019). Die Schlote der Tiefsee stoßen unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Schwermetalle (Eisen, Sulfide) und Gase (Methan, Wasserstoff, Chlor, H₂S) aus und weisen oft niedrige pH-Werte und Sauerstoffkonzentrationen auf (Kawagucci et al. 2016; Vosloo et al. 2013; Wang et al. 2020; van Dover et al. 2001).

1.5. Phylogenie der Mollusken

Seit Beginn der systematischen Ordnung des Tierreiches wird versucht die Stammesgeschichte der Mollusken in phylogenetischen Analysen basierend auf wechselnden morphologischen und molekularen Merkmalen zu ergründen (Aktipis et al. 2008; Smith et al. 2011; Ayyagari und Sreerama 2020; Pohle et al. 2022). Die Einordnung der Mollusken-Klassen, die in Abbildung 1 widergegeben ist, ist durch die bisherige Forschung sehr gut unterstützt, dennoch gibt es für einzelne Ordnungen unterschiedliche und diskutierte Positionen in der Phylogenie, für einen Überblick siehe: Aktipis und Giribet 2012; Krug et al. 2022; Zapata et al. 2014; Giribet et al. 2006. Auch die Zusammenfassung dieser Ordnungen in verschiedene Taxa, wie das Taxon Aculifera, ist der Stand der heutigen Forschung und resultierte aus sich wandelnden Daten (Aktipis und Giribet 2010; Bouchet et al. 2017). Eine Übersicht über die Konversion dieser Zuordnungen findet sich unter anderem in PONDER et al. (2020). Grundlage meiner Arbeit ist die Prämisse, dass mit Hämocyanin-Sequenzen phylogenetische Analysen durchführbar sind, was in vorherigen Arbeiten von Schäfer et al. (2019), Streit et al. (2006) und Lieb und Markl (2004) gezeigt wurde. Auch wurden phylogenetische Analysen der Ferritin-Sequenzen bereits durchgeführt (Salinas-Clarot et al. 2011; Adameyko et al. 2021; Andrews et al. 1992; Andrews 2010).

1.6. Ziel

Meine vorgelegte Arbeit zielte darauf ab, eine umfassende Untersuchung der verfügbaren Transkriptomdaten von Mollusken hinsichtlich respiratorischer Proteine, wie Hämocyanin, Hämoglobin und Hämerythrin durchzuführen. Ich habe mehrere Schwerpunkte gesetzt, zum einen die Untersuchung auf respiratorische Proteine aller Mollusken-Klassen, wie auch die Vergleiche der Hämocyanin-Sequenzen mit den bereits bekannten Hämocyanin-Typen. Mittels der Erweiterung der verfügbaren Daten bezüglich der Hämocyanin-Sequenzen der Mollusken wurden phylogenetische Analysen mit diesen Sequenzdaten durchgeführt, um die Frage nach der Evolution des Hämocyanins in Mollusken und die Verwandtschaftsverhältnisse der Mollusken-Klassen in Bezug auf die Hämocyanine aufzuklären. Im Laufe der Forschung wurden immer neue Hämocyanin-Typen entdeckt und aufgrund der vielen Taxa, die noch nicht untersucht wurden, ist es wahrscheinlich weitere Typen zu entdecken. Den durchgeführten Analysen lag die Frage nach der Evolution der Hämocyanin-Gene und deren Vorkommen und Typus in einer umfangreicheren untersuchten Artenzahl der Mollusken zu Grunde. Des Weiteren welche Klassen und Familien Hämocyanine oder andere respiratorische Protein aufweisen und der Ursache, warum sich unterschiedliche Blutfarbstoffe in einem Phylum entwickelt haben.

Ein weiterer Schwerpunkt war die Untersuchung der Ferritine besonders im Hinblick auf die beiden Tiefsee-Gastropoden *C. squamiferum* und *G. aegis*. Die Ferritine sollten durch den Vergleich mit möglichst zahlreichen Ferritin-Sequenzen von Arten aus unterschiedlichen Habitaten erfolgen, was durch die parallelen Assemblierungen und Analysen der Ferritin-Sequenzen erfolgen sollte.

Alle diese Fragen sollten Hinweise auf die Anpassungsfähigkeit und die Wege der Adaptation von ubiquitären und lebensnotwendigen Proteinen geben, um Hinweise auf die Überlebensfähigkeit von Mollusken in Zukunft zu erhalten. Aufgrund der wirtschaftlichen und ökologischen Relevanz dieser artenreichen Metazoen-Gruppe sind diese Fragen sehr bedeutend und sollen Anstöße für weiterführende Forschungsfragen geben und das öffentliche Interesse fördern.

2. Material und Methoden

2.1. Hämocyanine

Für die *de novo* Assemblierungen wurden im ersten Schritt die Rohdaten aus dem Sequence Read Archive (SRA) im FastQ-Format (Cock et al. 2010) mit SRA-Toolkit Version 3.0.6 oder neuer in Geneious® R9 importiert. „Paired reads“ wurden mit „set paired reads“ gesplittet und anschließend mit BBDuk Adapter/Quality Trimming (Version 35.49 by Brian Bushnell) getrimmt (Standardparameter). Für die iterative Assemblierung der Hämocyanin-Sequenzen wurden die reads gegen *Megathura crenulata* (mRNA hemocyanin1 AJ698339.2) gemappt. Die Konsensussequenz zeigte ggf. vorhandene Übereinstimmungen von KLh1 mit den „gemappten“ reads. Es wurde ein möglichst langer und eindeutiger Sequenzabschnitt aus der Konsensussequenz als Referenz-Sequenz extrahiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis entweder keine Reads mehr „mappten“, bei 3' ein Stopcodon das Ende des Open Reading Frames (ORF) anzeigte und 5' auch ein Stopcodon oder keine eindeutige Consensus Sequenz ermittelt werden konnte. Der so in Geneious® ausgewählte ORF wurde als vollständige Transkriptom-Sequenz des Hämocyanins verwendet. Die gleiche Vorgehensweise wurde für die Assemblierung von Hämoglobin (AM167926.1 *Biomphalaria glabrata*) und Hämerythrin (*Leptochiton rugatus* Hämerythrin KY929244.1) durchgeführt. Zusätzlich zu den neu assemblierten Sequenzen wurden bereits publizierte Hämocyaninsequenzen mit in die Analysen eingeschlossen. Grundsätzlich wurden die Nukleotid-Sequenzen mit dem in Geneious® R9 implementierten MUSCLE Algorithmus (Edgar 2004) aligniert (Standardparameter), die Aminosäuresequenzen (AS) mit ClustalW (Thompson et al. 1994) mit der Matrix Blosum (implementiert in Geneious®) und eine statistische Auswertung der Identity in % mit Microsoft® Excel® für Microsoft 365 MSO (Version 2405 Build

16.0.17628.20006) 64 Bit angeschlossen. Die Alignments dienten als Basis für die phylogenetischen Analysen. Um das beste Evolutionsmodell zu bestimmen, wurden in MEGA X (Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K 2018) „find best model“ mit den Alignments durchgeführt. Diese Modelle wurden für die Erstellung der jeweiligen Phylogramme gewählt (Del Amparo und Arenas 2023).

An die Assemblierung der Hämocyaninsequenzen der Peltospiridae wurde die Analyse der assemblierten Isoformen der Hämocyanine von *C. squamiferum* und *G. aegis* angeschlossen. Die Sequenzen wurden in die einzelnen FUs unterteilt, benannt nach der Position im Transkriptom mit FU 1 bis FU 8 bzw. FU 11 für die zweite Isoform. Die Teil-Sequenzen wurden in die AS Sequenzen in Geneious® translatiert. Um nun weiter zu untersuchen, welche FUs orthologe sind, wurden die einzelnen FUs der beiden Isoformen von *C. squamiferum* in einem Alignment verglichen und in einem weiteren die Sequenzen der in Tabelle 1 genannten Arten ebenso in die FUs unterteilt und ein Alignment in Geneious® mit ClustalW (Matrix Blosum) und Standardparameter der Sequenzen durchgeführt. Um die Clusterung darzustellen, wurde in Geneious® mit dem Plug-in PHYML tree (Guindon et al. 2010) ein ungewurzelter Baum mit dem AS Substitutions-Modell LG+G+I mit dem Branch support bootstrap 100 berechnet. Dieses Vorgehen zur Bestimmung orthologer Hämocyanin-Sequenzbereiche entspricht dem bereits publizierten von Lieb et al. (1999), Lieb und Markl (2004) und Warnke et al. (2011; Yao et al. 2019).

Tabelle 1: Übersicht der Arten mit Angaben zu Subklasse, (Super-)Ordnung und Familie für die Analyse der FUs der Peltospiridae Hämocyaninaminosäure-Sequenzen, aligniert mit ClustalW (Blosum (Standardparameter)) und die anschließende Berechnung des Phylogramms mit dem AS Substitutions-Modell LG+G+I in PHYML.

Subklasse	Ordnung/Superordnung	Familie	Spezies
<i>Neomphaliones</i>	<i>Neomphalida</i>	<i>Neomphalidae</i>	<i>C. squamiferum</i> h 1, h 2
<i>Neomphaliones</i>	<i>Neomphalida</i>	<i>Peltospiridae</i>	<i>G. aegis</i> h 2
<i>Vetigastropoda</i>	<i>Lepetellida</i>	<i>Fissurellidae</i>	<i>Megathura crenulata</i> h 1
<i>Caenogastropoda</i>	<i>Neogastropoda</i>	<i>Muricidae</i>	<i>Rapana venosa</i> h 2
<i>Coleoidea</i>	<i>Sepiida</i>	<i>Sepiidae</i>	<i>Sepia officinalis</i> h 1

Somit konnte bestimmt werden, welche Sequenzbereiche die größte Ähnlichkeit zueinander aufwiesen und somit orthologe Sequenzabschnitte sind.

Diese Vorgehensweise zur Ermittlung der orthologen FUs wurde für die Hämocyanin-Sequenz von *Laevipilina hyalina* mit den in Tabelle 2 genannten Hämocyanin-Sequenzen wiederholt.

Tabelle 2: Übersicht der Arten mit Angabe zu Subklasse, (Super-)Ordnung und Familie für die Analyse der FUs der Monoplacophora-Hämocyaninaminosäure-Sequenzen, aligniert mit ClustalW (Blosom (Standardparameter) und die anschließende Berechnung des Phylogramms mit dem AS Substitutions-Modell LG+G in PHYML.

Subklasse	Ordnung/Superordnung	Familie	Spezies
	<i>Neopilinida</i>	<i>Neopilinidae</i>	<i>Laevipilina hyalina</i>
<i>Heterobranchia</i>	<i>Stylommatophora</i>	<i>Helicidae</i>	<i>Cornu aspersum alphaN</i>
<i>Vetigastropoda</i>	<i>Lepetellida</i>	<i>Fissurellidae</i>	<i>Megathura crenulata h 1</i>
<i>Caenogastropoda</i>	<i>Neogastropoda</i>	<i>Muricidae</i>	<i>Rapana venosa h 2</i>
<i>Coleoidea</i>	<i>Sepiida</i>	<i>Sepiidae</i>	<i>Sepia officinalis h 1</i>

Anschließend wurden die orthologen Sequenzabschnitte aller hier vorhandenen Hämocyanin-Sequenzdaten der Mollusken (FU-b bis FU-g) und aller Gastropoden (vollständige Sequenzen) und die Sequenzen auf Unterklassen Ebene (*Caenogastropoden*, *Vetigastropoden*, *Heterobranchia*, *Neomphaliones*) und Ordnung (*Trochida*, *Lepetellida*) in Geneious® aligniert (MUSCLE, Standardparameter (Edgar 2004)).

Ein Phylogramm wurde mit den Hämocyaninsequenzen von FU-b bis FU-g der Mollusken in Geneious® R9 mit PHYML berechnet. Die Baumrekonstruktion wurde mit dem zuvor ermittelten besten Evolutionsmodell durchgeführt, mit dem Bootstrap-Verfahren (Bootstrap-Wert 100).

Für weitere Untersuchungen wurden das Genom von *C. squamiferum* und von *G. aegis* mit megablast von NCBI (Altschul et al. 1990) gegen die Transkriptom-Sequenz der Hämocyanine aligniert. Die entsprechende Gensequenz auf *C. squamiferum* wurde anschließend in GeneWise (Madeira et al. 2022) gegen die translatierte Proteinsequenz gemappt. Das Ergebnis gab die Exons und Introns mit der jeweiligen Sequenz und Phase aus. Das Vorgehen wurde mit den Sequenzen von *G. aegis* wiederholt.

Für die Analyse von Hämocyaninen der Bivalvia habe ich die Genome der Arten *Tegillarca granosa* (GCA_029721355.1), *Potamilus streckersoni* (GCA_016746295.1), *Megaloniais nervosa* (GCA_016617855.1) und *Margaritifera margaritifera* (GCA_029931535.1) gegen KLH1 (AJ698339.2) oder *Nautlius pompilius* (AJ619741.1) mit der Blast Suche BlastN (Altschul et al. 1990) auf Hämocyanin-Gene untersucht.

Auch die Genom-Daten von *Haliotis laevigata* (GCA_008038995.1) wurden nach Hämocyanin-Genen mit der Hämocyanin-Sequenz von *Haliotis rubra* H1 und H2 mit Megablast NCBI durchsucht.

2.2. Material und Methoden Ferritin

Die vorhandenen Sequenzen von Mollusken Ferritinen wurden aus NCBI im FASTA Format in Geneious® R9 importiert. Ebenso wurden die bereits vorhandenen Rohdaten aus dem SRA, analog

zu den Hämocyanin-Daten, zur Assemblierung weiterer Ferritin-Sequenzen genutzt. Das Vorgehen entspricht dem vorgenannten. Das Mapping erfolgte gegen XM_046507816.1 (*Haliotis rufescens*). Im Anschluss wurden zur Analyse 98 Sequenzen (siehe Anhang Tabelle 13) mit MUSCLE (implementiert in Geneious®) mit Standard-Parametern aligniert. Alle Sequenzen wurden mit dem ORF analysiert, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erreichen. Einzelne Alignments wurden mit Gastropoda (50 Sequenzen), Polyplacophora (13 bzw. 12 Sequenzen, ohne *Liolophura japonica*), Caudofoveata (6 Sequenzen), Scaphopoda (3 Sequenzen) und Solenogastres (2 Sequenzen) erstellt. Ebenso wurden weitere Alignments auf Unterklassen-Ebene wiederholt: Caenogastropoda (7), Autobranchia (18), Coleoidea (3), Heterobranchia (4), Neomphaliones (2) und Vetigastropoda (37 Sequenzen). Das Alignment mit 98 Sequenzen wurde in die Aminosäuresequenzen übersetzt und in MEGA (Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K 2018) importiert. Es wurde der Algorithmus „find best Model“ mit dem importierten MUSCLE-Alignment mit allen 98 Nukleotid-Sequenzen durchgeführt und ein Phylogramm in Geneious R9® mit PHYML und dem ermittelten Evolutionsmodell und Bootstrapverfahren 100 berechnet. Die Distanzmatrices der Alignments wurden in MS Excel® importiert und hier mit Mittelwert und Standardabweichung analysiert und ebenfalls die Sequenz-Längen der ORFs mit dem gewichteten Mittelwert ausgewertet.

Die Ergebnisse wurden grafisch in MS Excel® dargestellt.

Die Phylogramme wurden mit der Web-applikation iTOL bearbeitet (Letunic und Bork 2024).

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Assemblierung und Analyse der Hämocyanine

Die assemblierten Hämocyanin-Sequenzen wurden im Fasta-Dateiformat im Supplement hinterlegt. Eine Übersicht der Ergebnisse der *de novo* assemblierten Sequenzen mit Angabe der Spezies, der Accession-Nummer der Rohdaten und der Sequenzlänge in bp sind in Tabelle 9 im Anhang gelistet. Ein Überblick über die Ergebnisse wird im Folgenden gegeben.

Die Anzahl der untersuchten Transkriptomdatensätze der einzelnen Mollusken-Klassen war unterschiedlich hoch und die Verteilung in % der insgesamt 103 untersuchten Datensätze ist in Diagramm 1 dargestellt.

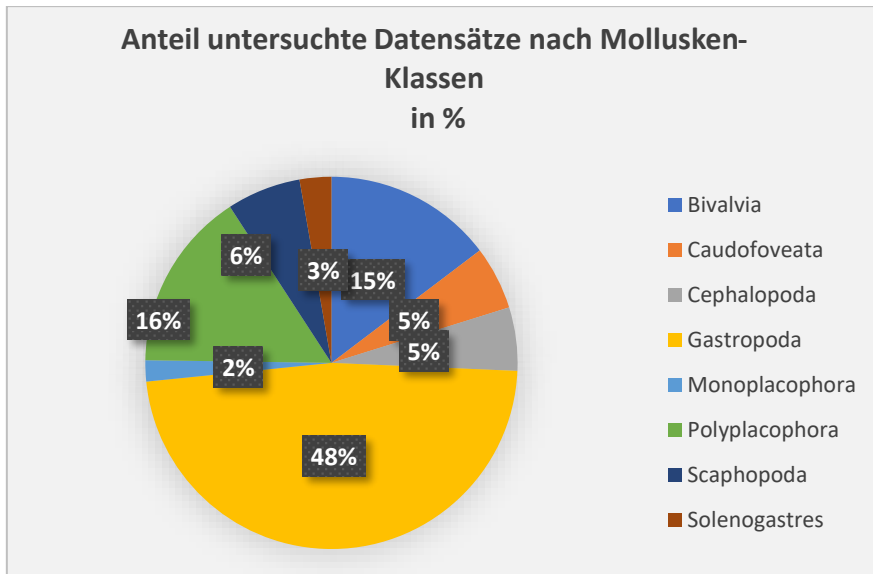


Diagramm 1: Prozentuale Verteilung der untersuchten Rohdatensätze der Transkriptomdaten bezogen auf die Mollusken-Klassen

Der Fokus meiner Arbeit lag originär auf der Analyse der Hämocyanine der Gastropoden, weshalb ein Großteil der untersuchten Datensätze von Gastropoden stammte. Dies spiegelt sich folglich in den assemblierten Hämocyanin-Sequenzen wider, wie Diagramm 2 darlegt. Für Solenogastres und Scaphopoda konnten keine Hämocyanin-Sequenzen assembliert werden, weswegen sie nicht dargestellt wurden.

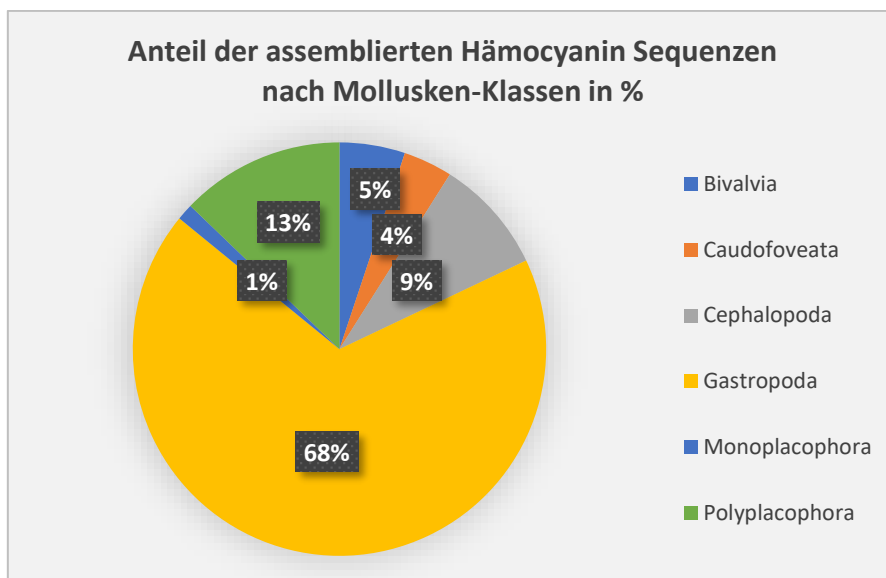


Diagramm 2: Anteil der assemblierten Hämocyanin-Sequenzen der untersuchten Transkriptomdaten der Mollusken-Klassen in Prozent anteilig aller assemblierten Hämocyanin-Sequenzen

Die Ergebnisse zu den untersuchten Hämocyaninen der einzelnen Mollusken-Klassen in alphabetischer Reihenfolge schließen sich hier an.

3.1.1. Hämocyanine der Bivalvia

Es wurden für 16 Bivalvia-Spezies Rohdaten aus dem SRA untersucht, welche den beiden Subklassen der Bivalvia Autobranchia und Protobranchia angehörten. Für Autobranchia, die ca. 10-mal artenreicher als Protobranchia sind (W.O.R.M.S), wird postuliert, dass diese Subklasse kein Hämocyanin aufweist (Mangum et al. 1987; PONDER et al. 2020). Dies wurde bereits 1987 bei zwei Arten dieser Subklasse, *Noetia ponderosa* (Noetiidae) und *Cyclocardia ventricosa* (Carditidae) bestätigt (Mangum et al. 1987). In dieser Arbeit wurden für 14 Autobranchia-Arten Transkriptomdaten auf enthaltene Hämocyanintranskripte untersucht. Diese gehörten neun Ordnungen mit Vertretern von 10 Familien an. Sechs dieser Arten leben limnisch oder auch im Brackwasser. Lediglich für eine Art, *C. plicata*, wurde im entsprechenden Transkriptom eine Hämocyanin-Sequenz mit einer Länge von 4.586 bp assembliert. Zurzeit liegt kein Genom von *C. plicata* vor, so wurden ersatzweise die anderen limnisch lebenden Autobranchia-Genome auf Hinweise eines Hämocyanin-Gens untersucht. Für *Margaritifera margaritifera* (GCA_029931535.1), *Megaloniais nervosa* (GCA_016617855.1), *Potamilus streckersoni* (GCA_016746295.1) und *Tegillarca granosa* (GCA_029721355.1) konnten in den Genomen keine Hinweise auf ein Hämocyanin-Gen gefunden werden. Somit ist die mögliche Erklärung für die assemblierte Sequenz, dass es sich um ein „Artefakt“ handelte und eine Kontamination durch aufgenommenen Nahrungspartikeln die Assemblierung ermöglicht hat. Es ist für eine Bestätigung der Hämocyanin-Sequenz die Sequenzierung des Genoms und/oder die Untersuchung der Hämolymphe dieser Spezies notwendig. Da keine dieser Optionen zur Verfügung stand, wurde die Sequenz in der weiteren Untersuchung nicht einbezogen.

In Protobranchia wurden bereits Hämocyanine nachgewiesen: für *Acila castrensis* (Morse et al. 1986), *Yoldia limatula* (Morse et al. 1986; Terwilliger et al. 1988; Mangum et al. 1987), *Solemya velum* (Mangum et al. 1987), *Nucula proxima*, *Cyclocardia ventricosa* (Mangum et al. 1987) und *Nucula hanleyi* (Toulmond et al. 1987; Lambert et al. 1995), *Nucula sulcata* (Morse et al. 1986; Terwilliger et al. 1988; Mangum et al. 1987; Lambert et al. 1995; Taylor et al. 1995; Bergmann et al. 2007) und *Nucula nucleus* (AJ786639.1 und AJ786640.1(Bergmann et al. 2007)). Die hier untersuchten Spezies gehörten zwei Ordnungen (Solemyida, Nuculida) und zwei Familien (Solemyidae, Nuculidae) an. Im Fall von *Ennucula tenuis* (Nuculida) konnte eine Teilsequenz mit 2.997 bp assembliert werden. Sie gehört, wie auch *Nucula nucleus*, zur Familie der Nuculidae. Für *Archarax bartschii* (Solemyida) konnte in den Transkriptomdaten kein Hämocyanin nachgewiesen werden. Genomdaten von Protobranchien lagen nicht vor, was eine weitere Untersuchung dieser

Subklasse nicht ermöglichte. Zudem wurden die Rohdaten der Bivalvia auf Spuren von Hämoglobin und Hämerythrin analysiert, keine Transkriptom-Sequenz dieser respiratorischen Proteine konnte assembliert werden.

3.1.2. Hämocyanine der Caudofoveata

Für Caudofoveata wurden Sequenz-Daten von sechs Arten in der Analyse untersucht. Bei zwei Arten der Gattung *Falcidens* konnten Teil-Hämocyaninsequenzen assembliert werden. Für *F. caudatus* mit einer Länge von 1.560 bp, für *F. sagittiferus* mit 4.422 bp allerdings mit 24 uneindeutigen Codons, für *Falcidens crossotu* (AM949571, AM949572) wurden ebenfalls Teilsequenzen veröffentlicht (Lieb und Todt 2008). Für die dritte hier untersuchte Art der Chaedodermatidae *C. nitidulum* konnte ebenso eine Teil-Hämocyaninsequenz assembliert werden (1.998 bp). Für die drei weiteren Spezies aus den Familien Prochaetodernatidae (*P. californicum*, *S. clenchi*) und Limifossoridae (*S. ventrolienatus*) konnten keine Hinweise auf Hämocyanine gefunden werden. Die Rohdaten der Caudofoveaten wurden auch auf Hinweise auf Hämoglobin und Hämerythrin analysiert und es konnten keine Hämoglobin- oder Hämerythrin-Sequenzen assembliert werden. Einzelne „reads“ mappten zwar beim Alignment der Sequenz-Daten von *S. californicum* und *S. clenchi* gegen Hämoglobin, jedoch konnten keine längeren Sequenzen assembliert werden. Eine weitere Auswertung der Teilsequenzen wurde nicht vorgenommen, da die Sequenzen nicht ausreichend lang assembliert werden konnten oder zu viele uneindeutige Codons enthielten. Eine weitere Überprüfung der Ergebnisse konnte wegen fehlender Genom-Daten und Gewebeproben nicht durchgeführt werden.

3.1.3. Hämocyanine der Cephalopoda

Cephalopoden gliedern sich in die beiden morphologisch sehr unterschiedlichen Unterklassen Coleoidea und Nautiloidea, wobei Nautiloidea die Ordnung Nautilida beinhaltet und Coleoidea sich in die Superordnungen Decapodiformes und Octopodiformes untergliedert (W.O.R.M.S). Octopodiformes wird in die Ordnung Octopoda und Vampyromorpha gegliedert, Decapodiformes gliedern sich in sechs Ordnungen, siehe Abbildung 14 (W.O.R.M.S). Die Hämocyanin-Genstruktur der Cephalopoden gliedert sich in den Sepia-Typ mit der Duplikation der FU-d und dem Fehlen der FU-h (Lamy et al. 1998) und den Nautilus-Typ, welcher mit sieben FUs (FU-a bis FU-g) (Bergmann

et al. 2006) der kürzeste Hämocyanin-Typ ist. Dem Nautilus-Typ sind Nautiloidea und Octopoda zuzuordnen (Gielens et al. 1986; Lamy et al. 1987; Bergmann et al. 2006).

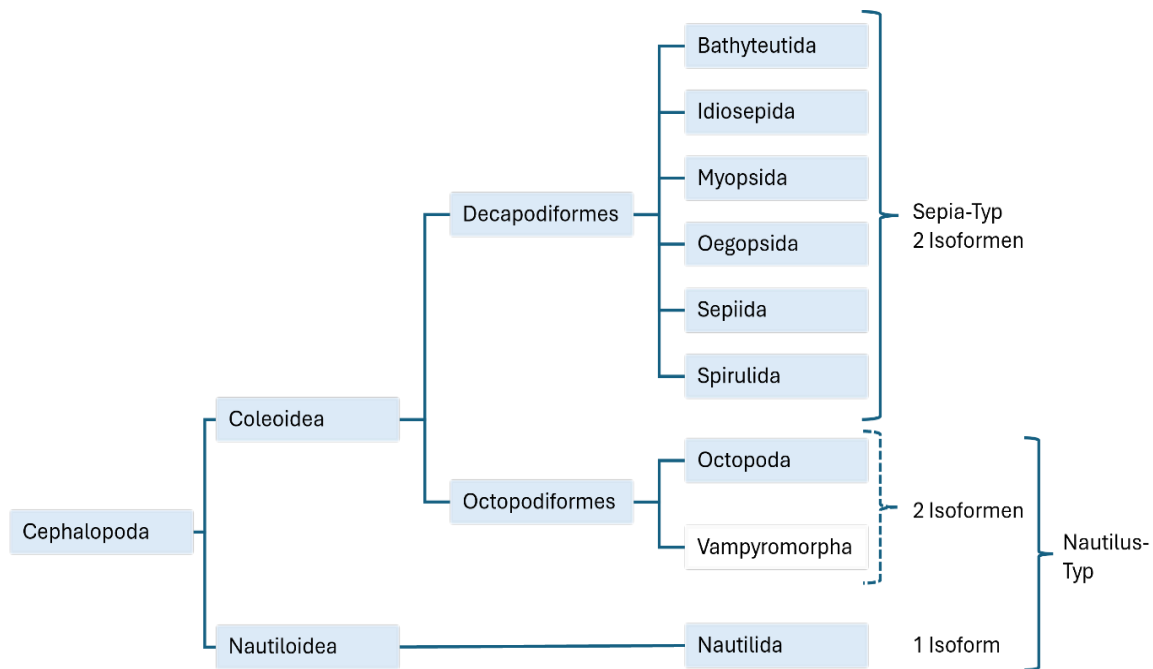


Abbildung 14: Kladogramm der Cephalopoden mit Subklassen, Superordnungen, Ordnungen adaptiert nach (Lamy et al. 1998) mit Angabe des Hämocyanin-Typs und der Anzahl bekannter Isoformen. Für Vampyromorpha lagen keine Daten vor, die Hypothese, dass diese Ordnung ebenso über zwei Hämocyanin-Isoformen verfügt, ist hier mit der gestrichelten Klammer dargestellt (adaptiert nach Bergmann et al. (2006), Lamy et al. (1998)).

Für den einzigen Vertreter der Vampyromorpha *Vampyroteuthis infernalis* lagen keine Hämocyanin-Sequenzen vor. Aus den vorliegenden Transkriptomdaten aus Armgewebe konnte kein Hämocyanin assembliert werden, der Nautilus-Typ für diese Ordnung kann hier nicht bestätigt werden (die Darstellung in Abbildung 14 ist eine Hypothese). Insgesamt lagen für Cephalopoda bereits einige cDNA-Hämocyanin-Sequenzen vor. Für die Sepia *Euprymna scolopes* (KF647898.1, KF647897.1) lagen zwei Isoformen, für *Sepia officinalis* (DQ388569.1, DQ388570.1, KF306341) lagen drei Isoformen vor, für *Nautilus pompilius* (AJ619741.1), sowie *Enteroctopus dofleini* (AF020548.1) und *Sepiella inermis* (KF152913.1) jeweils eine Sequenz. Für *S. inermis* und *N. pompilius* wurde untersucht, ob eine zweite Hämocyanin-Sequenz assembliert werden konnte, da hier Transkriptomdaten zur Verfügung standen. Mit den vorliegenden SRA-Daten konnten keine weiteren Hämocyanin-Sequenzen assembliert werden. Die für *S. inermis* verfügbaren Transkriptomdaten wurden aus dem Eingeweidesack oder Gehirn sequenziert. Beide Datensätze wiesen keine ausreichende Anzahl an „reads“ aus dem Transkriptom auf, um eine Assemblierung durchzuführen. Für *N. pompilius* wurden Sequenzdaten aus dem Mantel herangezogen. Es wurde lediglich die bekannte Hämocyanin-Sequenz assembliert, keine zweite Isoform. Dieser Befund wurde durch eine Blast-Suche im 2021 veröffentlichten Genom von *N. pompilius* bestätigt. Es

konnte kein zweiter Gen-Locus gefunden werden, was den Befund von Bergmann et al. (2006) bestätigt.

Insgesamt wurden sieben Hämocyanin-Sequenzen von Cephalopoden in die Analysen eingeschlossen. Die Identität der Hämocyanin-Sequenzen bewegte sich zwischen 60 % und 97 % (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Distanzmatrix des Alignments der Cephalopoda mit den Sequenz-Identitäten [%] von *N. pompilius* H1, *O. dofleini* H1, *E. scolopes* H1, H2, *S. officinalis* H1, H2 und *S. maindroni* H1

Spezies	NpH 1 b bis g	OdH 1 b bis g	EsH 1 b bis g	EsH 2 b bis g	SoH 2 b bis g	SoH 1 b bis g	SmH 1 b bis g
NpH 1 b bis g		60	60	61	61	61	61
OdH 1 b bis g	60		68	70	70	68	68
EsH 1 b bis g	60	68		80	75	79	79
EsH 2 b bis g	61	70	80		81	75	75
SoH 2 b bis g	61	70	75	81		82	81
SoH 1 b bis g	61	68	79	75	82		97
SmH 1 b bis g	61	68	79	75	81	97	

Die cDNA-Sequenzen der Sepien wiesen eine Identität untereinander von 75 % bis 97 % auf. Die Hämocyanin-Isoformen der beiden Vertreter der Sepiidae *S. officinalis* und *S. inermis* haben die höchste Identität zueinander (81 % bzw. 97 %). *E. scolopes* (*Sepiolidae*) hat zu 80 % identische Hämocyanin-Isoformen und zu den anderen Sepien eine Identität zwischen 75 % und 81 %, zu *N. pompilius* 60 % und 68 % zu *O. dofleini*. Die jeweiligen Isoformen der untersuchten Hämocyanine haben mit ca. 80 % eine hohe Identität zueinander, welche sich sonst zwischen 60 % und 70 % bewegt (Altenhein et al. 2002; Bergmann et al. 2007). Herausstechend ist, dass die jeweiligen Isoformen 1 von *S. officinalis* und *S. maindroni* die höchste Identität mit 97 % Identität zueinander aufweisen, die Isoform 2 von *S. officinalis* ist zu 82 % identisch zu Isoform 1 (Thonig et al. 2014).

Weitergehend konnten keine Nachweise für Hämoglobin oder Hämerythrin in den Sequenz-Daten der Cephalopoden gefunden werden.

3.1.4. Hämocyanine der Gastropoda

Ein Fokus in meiner Arbeit wurde auf die bei weitem artenreichste und vielfältigste Klasse der Mollusken, die Gastropoden, gelegt. Insgesamt wurden Rohdaten von 50 Spezies auf das Vorkommen von Sequenzen kodierend für Hämocyanin, Hämoglobin oder Hämerythrin untersucht. Es konnten 31 Hämocyanin-(Teil-) Sequenzen assembliert werden, mit Sequenzlängen zwischen 1.044 bp und 14.085 bp. Für die Teil-Sequenzen wurden typische Motive wie z.B. PYWDW und WHRL der Hämocyanine identifiziert (Miller et al. 1998; Lieb et al. 2000). Für die weiteren

Analysen in meiner Arbeit waren diese Sequenzen zu kurz, somit wurden diese Sequenzen in der Ergebnisliste (Tabelle 9) aufgeführt, aber nicht in die weitere Betrachtung eingeschlossen. Hinweise auf Hämoglobin oder Hämyerthrin konnten in keinem der Datensätze gefunden werden. Wie bereits erläutert, wurden für die Alignments der Hämocyaninsequenzen die orthologen Bereiche der FU-b bis FU-g bei allen Mollusken einbezogen, bei den Gastropoden die vollständigen Hämocyanin-Sequenzen (Ausnahme *Haliotis tuberculata* und *C. paradoxum* beide FU-c bis FU-g). Besondere Bedeutung kam der Betrachtung und Assemblierung der Hämocyanin-Sequenzen der beiden Tiefsee-Spezies *C. squamiferum* und *G. aegis* aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften (hypertrophierte Ösophagus-Drüse und überdurchschnittlich großer Habitus (Chen et al. 2015c; Chen et al. 2015d)) und ihrer spezifischen Anpassungen an den Lebensraum in unmittelbarer Nähe von heißen Schloten zu (Rogers et al. 2012; Lan et al. 2021; Lan et al. 2022). Die assemblierten Sequenzen der Isoform 1 wiesen die Struktur vom „Keyhole limpet Typ“ auf, die jeweils zweite assemblierte Isoform hatte einen um ca. 3.750 bp längeren ORF im Vergleich zur Isoform 1. Zur weiteren Analyse der Sequenz-Struktur wurden einige Hämocyaninaminosäure-Sequenzen von verschiedenen Vertretern der Mollusken in die einzelnen FUs unterteilt. Die Sequenzen wurden in Geneious[®] mit ClustalW (Larkin et al. 2007) aligniert. Das Alignment war die Basis für das Phylogramm (LG+G+I in PHYML (Guindon und Gascuel 2003; Le und Gascuel 2008)) mit 54 Sequenzen in Abbildung 15.

Aus der Analyse der Sequenzen der einzelnen FUs der Hämocyanin-Sequenzen (CsH 1, CsH 2, GaH2, KLH 1, RvH 2, SoH 1) konnte im Phylogramm ermittelt werden, dass die jeweiligen FU-Sequenzen der CsH 1 denen der FU-a bis FU-h in numerischer Reihenfolge den bekannten orthologen Sequenzen der FUs entsprachen. Für die Sequenzen der CsH 2 und GaH 2 wies die FU-1 die größte Ähnlichkeit mit den FU-a der alignierten Sequenzen auf, FU-2 bis FU-4 und FU-6 mit den Sequenzen der FU-c, FU-5 mit FU-b, FU-7 entsprach der FU-d, FU-8 der FU-e, FU-9 entsprach FU-f, FU-10 war FU-g und FU-11 wies die größte Ähnlichkeit mit FU-h auf. Somit ergab sich folgende Struktur der Transkriptions-Sequenzen von Isoform 2 der beiden Peltospiridae (Abbildung 16).

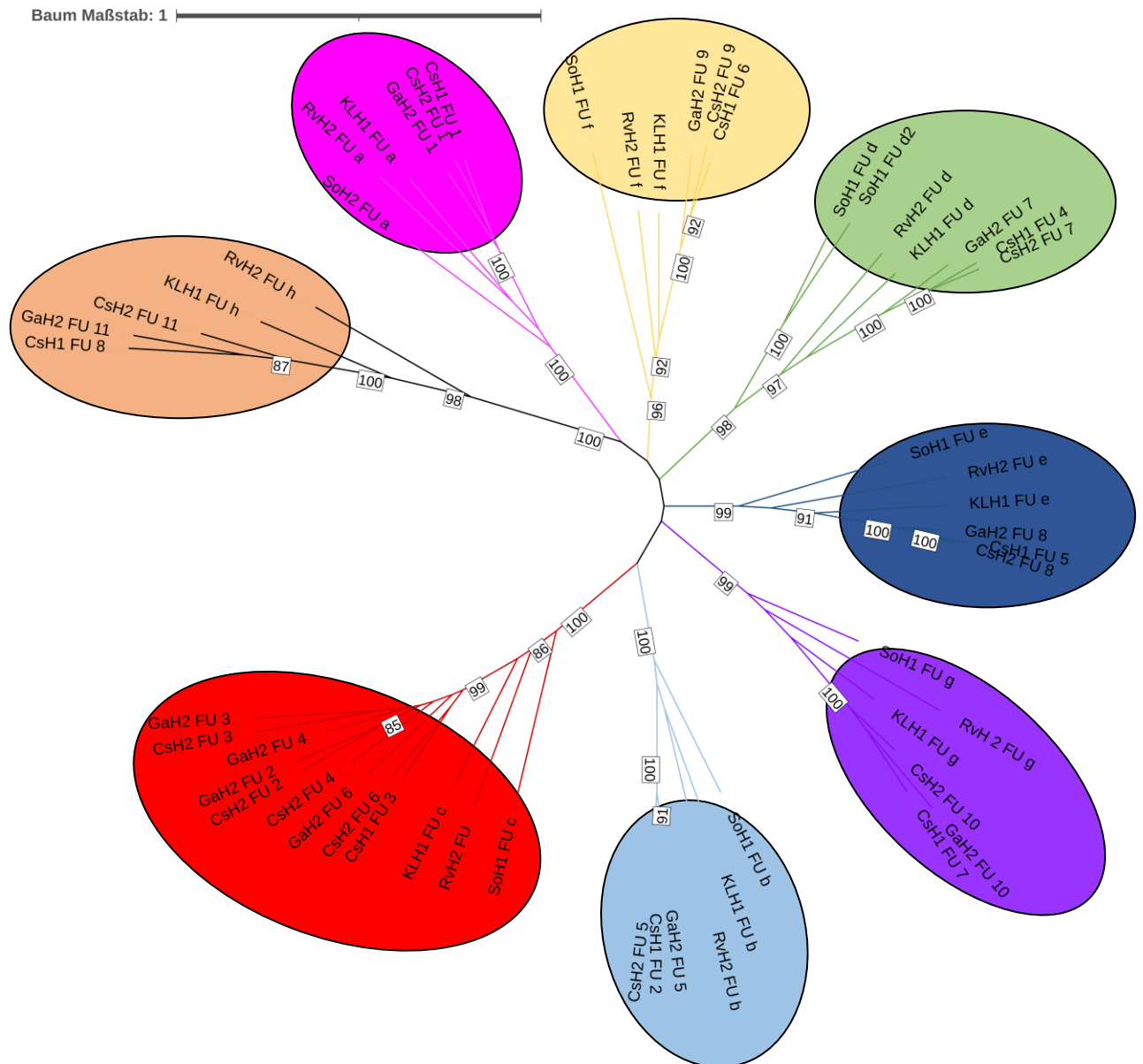
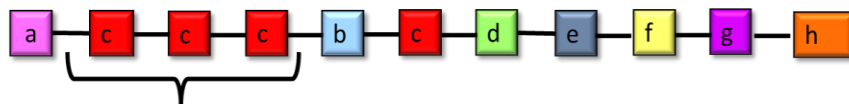


Abbildung 15: Ungewurzelter Baum (PHYML in Geneious® (LG+G+I Bootstrap 100 (Standardparameter))), mit den einzelnen FUs von *C. squamiferum* H 1 und H 2 und *G. aegis* H 2 nummeriert nach der Position in der Aminosäure-Sequenz 1 bis 8, bzw. 1 bis 11, sowie den FUs der folgenden Hämocyanin-Sequenzen: *S. officinalis*, *R. venosa* H 2 und KLH 1. Die orthologen FUs sind in der gleichen Farbe dargestellt und gruppieren in den jeweiligen Ästen. Bootstrapwerte unter 85 sind ausgeblendet.

Peltospiridae-Typ



Triplikation von FU-c in h 2

Abbildung 16: Ermittelte Gen-Sequenzstruktur der Hämocyanin-Isoform 2 von *C. squamiferum* und *G. aegis* mit der Triplikation der FU-c zwischen FU-a und FU-b.

Das Alignment der FUs der beiden Isoformen von *C. squamiferum* diente ebenso der Feststellung der Ähnlichkeit und der Darstellung der konservierten Bereiche in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen (Abbildung 17).

Die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen der FUs der beiden Isoformen von CsH wiesen die konservierten Motive der Hämocyanine in den grün gefärbten Sequenzbereichen auf. Auch die zusätzlichen FUs (CsH 2 FU-2 bis CsH 2 FU-4) wiesen die bekannten Motive der FUs der Hämocyanine auf, da in den grünen konservierten Bereichen keine abweichenden Aminosäure-Sequenzen, wie aus Abbildung 17 ersichtlich, festgestellt wurden. Die Hintergrundfarbe der Aminosäuren, die in allen FUs identisch sind, wurden grün hinterlegt, hellgrün entsprach einer Ähnlichkeit von 80 -100 %, gelb 60 % - 80 % und bei weniger als 60 % ist kein farbiger Hintergrund hinterlegt.

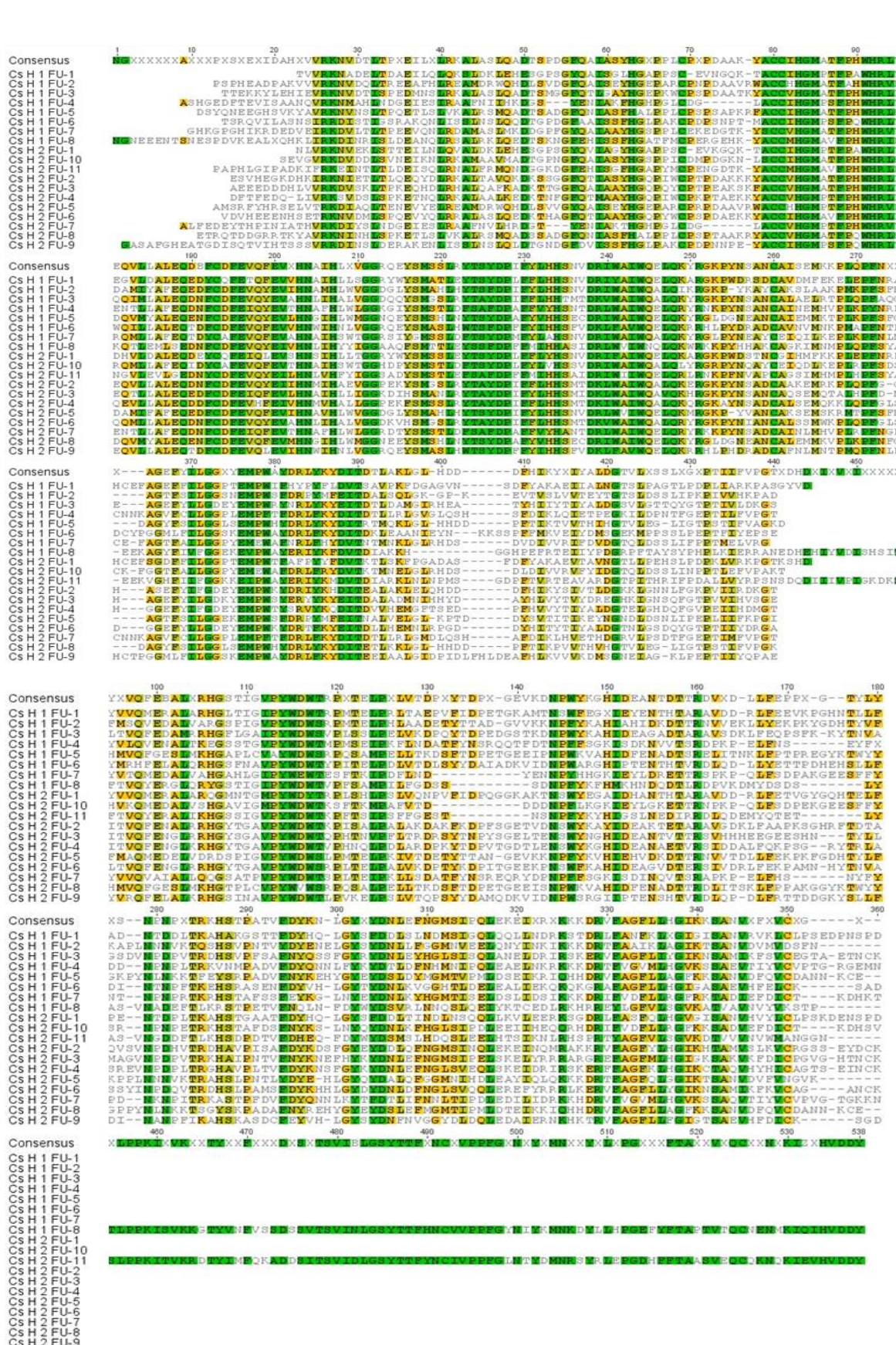


Abbildung 17: Alignment der beiden abgeleiteten Hämocyanin-Proteinsequenzen CSH 1 und CSH 2, unterteilt in die einzelnen FUs in Geneious®, mit ClustalW mit der Matrix blosum62 (mit einem Threshold von 1) wo hochkonservierte Aminosäuren dunkelgrün hinterlegt (100%) sind, eine Ähnlichkeit der Aminosäuren zwischen 80 und 100 % wurde mit hellgrün hinterlegt und eine Ähnlichkeit von 60 % bis 80 % der Aminosäuren mit gelb hinterlegt wurde. Bei einer Ähnlichkeit von weniger als 60 % der Aminosäuren wurde keine Farbe hinterlegt.

Um weitere Erkenntnisse über die Hämocyanin-Sequenzen zu erhalten, wurden die assemblierten Sequenzen der beiden Peltospiridae mit Hilfe der Blast-Funktion von NCBI gegen die entsprechenden veröffentlichten Referenz-Genome „gemappt“. Hier zeigte sich für *C. squamiferum* eine Übereinstimmung der Transkriptom-Sequenz mit der Gen-Sequenz. Im Anschluss wurden die Aminosäure-Sequenzen in Geneious® gegen den so lokalisierten Genom-Abschnitt zur Kontrolle „gemappt“. Die Aminosäure-Sequenz wurde gegen den lokalisierten Gen-Abschnitt in GeneWise für die Bestimmung der Exon-Intron-Struktur und der Phasen der Gen-Abschnitte aligniert. Die Sequenzbereiche werden in Tabelle 4 gegenübergestellt und die entsprechende Länge der Sequenzbereiche mit der jeweiligen Phase und die FU zugeordnet.

Tabelle 4: Ergebnisse der Analyse der Gen-Sequenz gegen die AS-Sequenz von CsH 2. Gezeigt wird die Exonlänge laut GeneWise und dem megablast Alignment aus NCBI für CsH 2 mit Angabe zu Phase und FU, Länge der Exons in nt.

GeneWise result CsH 2						Megablast result CsH 2			
Gene	nt	nt	nt	nt	nt	FU	nt	nt	nt
Gene	12	63809				FU			
Exon	12	68	phase	0	56	s	24903384	24903445	61
Exon	41658	41778	phase	0	120	s			
Exon	43165	43413	phase	1	248	a	24904834	24905081	247
Exon	44338	44659	phase	1	321	a	24905996	24906329	333
Exon	45223	45474	phase	2	251	a	24906889	24907141	252
Exon	45661	46070	phase	2	409	a	24907326	24907737	411
Exon	46549	47793	phase	1	1244	c	24908230	24909460	1230
Exon	48403	49638	phase	1	1235	c	24910081	24911304	1223
Exon	50462	51700	phase	1	1238	c	24912128	24913367	1239
Exon	52234	52490	phase	1	256	b	24913918	24914157	239
Exon	52701	53667	phase	0	966	b	24914350	24915334	984
Exon	54074	55312	phase	1	1238	c	24915761	24916979	1218
Exon	55527	56750	phase	1	1223	d	24917191	24918417	1226
Exon	57150	58400	phase	1	1250	e	24918815	24920067	1252
Exon	58693	59940	phase	1	1247	f	24920356	24921609	1253
Exon	60256	60474	phase	1	218	g	24921921	24922144	223
Exon	60907	61070	phase	1	163	g	24922567	24922738	171
Exon	61259	62090	phase	0	831	g	24922924	24923757	833
Exon	62320	63809	phase	1	1489	h	24923987	24925479	1492

Dieses Vorgehen wiederholte ich für CsH 1, um auszuschließen, dass beide Sequenzen auf demselben Locus liegen, was entweder für eine falsche Assemblierung oder alternatives Spleißen spräche. Die Analyse der CsH 1 mit GeneWise und der Blast-Suche gegen HtH 1 ergab folgende Ergebnis-Tabelle (Tabelle 5):

Tabelle 5: Ergebnisse der Analyse der Gen-Sequenz gegen die AS-Sequenz von Csh 1. Gezeigt wird die Exonlänge laut GeneWise und dem megablast Alignment aus NCBI für Csh 1 mit Angabe zu Phase und FU, Länge der Exons in nt. Chromosom 6 gegen Hth1 nach Lieb et al. (2001)

GeneWise result Csh 1						Megablast result Csh 1			Hth1 *
Gene	340120	359202	Phase	bp	FU			bp	bp
					S				32
Exon	340120	340171	0	51	S	24932760	24932811	51	16
Exon	342017	342265	1	248	a	24934655	24934906	251	350
Exon	343487	343808	1	321	a	24936126	24936450	324	221
Exon	344347	344601	2	254	a	24936983	24937241	258	255
Exon	345497	345906	2	409	a	24938131	24938546	415	407
Exon	346582	346838	1	256	b	24939222	24939483	261	1245
Exon	347139	348105	0	966	b	24939779	24940745	966	
Exon	348520	349767	1	1247	c	24941160	24942407	1247	1242
Exon	350194	351417	1	1223	d	24942832	24944057	1225	1239
Exon	351741	352991	1	1250	e	24944376	24945631	1255	1260
									191
Exon	353188	354429	1	1241	f	24945826	24947070	1244	1060
Exon	354944	355162	1	218	g	24947579	24947804	225	219
Exon	355658	355821	1	163	g	24948297	24948466	169	164
Exon	356409	357240	0	831	g	24949049	24949881	832	826
Exon	357704	359202	1	1498	h	24950340	24951845	1505	1535

Die angegebenen Sequenzlängen für die einzelnen FUs aus GeneWise stimmen mit den assemblierten Ergebnissen überein. Aus den Ergebnissen der Blast-Suchen zeigte sich, dass die beiden Gene auf unterschiedlichen Loci auf Chromosom 6 liegen. Bei der Blast-Suche der einzelnen FUs von *G. aegis* gegen das Referenz-Genom erhielt ich keine Resultate, die die vollständige Transkriptom-Sequenzlänge abdeckten. Lediglich die als „hemocyanin 1-like“ benannte Nukleotidsequenz mit der Accession NW_024537289.1 mit einer Länge von 5.388 bp wurde gefunden. Die Referenzgenome beider Peltospiridae-Spezies sind auf Chromosom-Ebene publiziert worden, das Genom von *G. aegis* ist mit 1.15 Gb und einer Vollständigkeit von 94,6 % (Lan et al. 2021) deutlich größer als das Genom von *C. squamiferum* mit 404 Mb mit einem BUSCO score von 96,6 % (Sun et al. 2020a; Lan et al. 2021). Daraus folgt, dass für *G. aegis* ca. 62,1 Mb und für *C. squamiferum* ca. 13,7 Mb nicht assembliert wurden, ergo die Hämocyanin-Gene im *G. aegis*-Genom könnten in diesem nicht assemblierten Bereich liegen.

Um den Grad der Identitäten der Hämocyaninsequenzen der Gastropoden zu vergleichen, wurden statistische Werte wie der Mittelwert und die Standardabweichung der Identitätswerte aus den Distanzmatrices der Alignments errechnet. Bei der statistischen Auswertung wurde *G. aegis* H 1 nicht mit einbezogen (Diagramm 3).

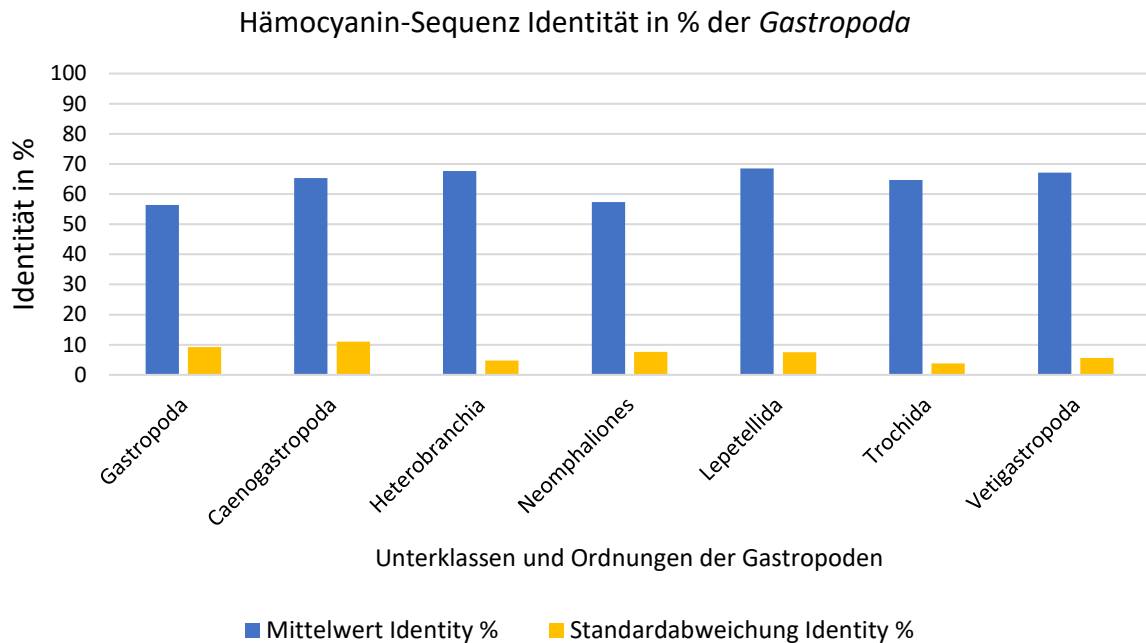


Diagramm 3: Vergleich der Sequenzidentitäten der Gastropoden Hämocyanine im Geneious® MUSCLE Alignment mit Standard-Parametern und Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung der Identität in % in der Distanzmatrix nach Unterklasse, Ordnung und aller Gastropoden-Hämocyanine unterteilt.

Der Mittelwert aller Identitätswerte der Alignments der Gastropoden reicht von 56 % bis 69 % Identität (Gastropoda bzw. Lepetellida). Der Mittelwert der Identität liegt bei Lepetellida und Heterobranchia mit 69 % am höchsten und bei Neomphaliones mit 57 % am niedrigsten, der Mittelwert der Identität des Alignments aller Gastropoden-Hämocyanine liegt bei 56 %. Die Standardabweichung liegt zwischen 4 % bei Trochida und 11 % bei Caenogastropoda, bei allen Gastropoden bei 9 %. Die Minimalwerte der Identität finden sich im Alignment aller Gastropoden mit 29 %, sonst zwischen 44 % (Caenogastropoda) und 64 % (Heterobranchia). Bei Lepetellida, Trochida und Vetigastropoda beträgt die niedrigste Identität 62 %, bei Neomphaliones 51 %. Die Maximalwerte unterscheiden sich dagegen, denn bei Trochida ist die maximale Identität bei 70 %, bei Heterobranchia bei 83 % und bei allen anderen Gastropoden-Ordnungen und den Gastropoden gesamt bei über 90 %. Im Alignment mit allen Gastropoden sind 32 Sequenzen enthalten (Distanzmatrix im Supplement hinterlegt).

Für *Haliotis laevigata* wurde eine Teilsequenz mit ca. 2.000 bp assembliert. Da für andere Haliotidae bereits je zwei Isoformen vorliegen, habe ich das vorliegende Genom von *H. laevigata* mit den Hämocyanin-Sequenzen von *Haliotis ruba* H1 und H2 durchsucht. Für jede der beiden Sequenzen konnte ich zwei Treffer finden, was darauf hinweist, dass im Genom von *H. laevigata* zwei diskrete Hämocyanine-Gene auf zwei Loci liegen, diese aber im Transkriptom nicht zu assemblieren waren. Die Ergebnisse aus megablast in NCBI sind in Tabelle 6 übertragen worden.

Tabelle 6: Ergebnis der megablast Suche in NCBI mit *Haliotis rubra* H1 und H2 gegen das Genom von *Haliotis laevigata*, angegeben sind: Sequenzbereich, Länge dieses Bereichs (=Exon) und korrespondierende FU

Haliotis laevigata isolate GL20151002 HLAEV1_scaffold511, whole genome shotgun sequence							
Sequenzbereich H2		Länge	FU	Sequenzbereich H1		Länge	FU
67765	67818	54	S	14074	14124	51	S
				22259	22613	355	S
74193	744117	225	a	23220	23442	223	a
75027	75291	265	a	24341	24595	255	a
76029	76439	411	a	24839	25251	413	a
77181	78420	1240	b	29839	31083	1245	b
78836	80082	1247	c	33072	34314	1243	c
80610	81856	1247	d	34653	35895	1243	d
82138	83396	1259	e	36223	37483	1239	e
83645	83835	191	f	37632	37822	191	f
84964	86024	1061	f	39645	40708	1064	f
86895	87118	224	g	41002	41223	222	g
87674	87839	166	g	42307	42472	166	g
88495	89330	836	g	43990	44818	829	g
89749	91285	1537	h	46110	47654	1545	h

Wu et al. (2016) haben die Hämocyanin-Sequenzen von *H. rubra* aus Mantelgewebe gewonnen, wie auch die Transkriptom-Daten von *H. laevigata* aus dem Mantelgewebe gewonnen wurden. Die Alignments in megablast von *H. rubra* H1 und H2 zeigten anhand der grafischen Zusammenfassungen, dass die Query-Sequenzen vollständig gegen das Genom von *H. laevigata* „mappten“ (Abbildung 18, Abbildung 19).



Abbildung 18: Als Query Sequenz wurde *H. rubra* H1 mit megablast gegen das Genom von *H. laevigata* „gemappt“, die alignierten Sequenzbereich der Exons sind rot dargestellt, die schwarzen Balken entsprechen den Introns.

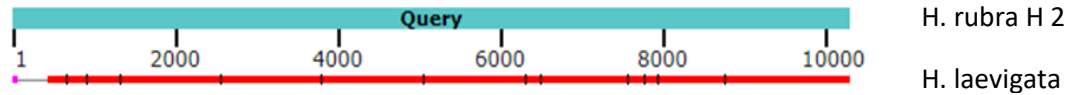


Abbildung 19: Als Query Sequenz wurde *H. rubra* H2 mit megablast gegen das Genom von *H. laevigata* „gemappt“, die alignierten Sequenzbereiche der Exons sind rot dargestellt, die schwarzen Balken entsprechen den Introns.

3.1.5. Hämocyanine der Monoplacophora

Die einzige Vertreterin der Monoplacophoren, deren Transkriptom-Daten hier untersucht werden konnten, ist *Laevipilina hyalina*, deren Verbreitungsgebiet sich entlang des Kalifornischen Schelfs erstreckt. Mit den Transkriptomdaten konnte eine vollständige Hämocyaninsequenz assembliert werden. Im Alignment zeigte die 10.293 bp lange Sequenz eine Übereinstimmung mit den „Keyhole limpet Type“. Dafür spricht das Ergebnis aus der Aufteilung der Sequenz analog der Analyse der Hämocyanin-Sequenzen der Peltospiridae in die FUs (Abbildung 20). Bestätigend kann festgestellt werden, dass die C-terminale FU länger ist als die anderen FUs, was für den Befund spricht, dass es sich hierbei um eine FU-h handelt. Für die genauere Untersuchung wurde hierzu, wie zuvor für die Peltospiridae, ein Alignment mit den einzelnen FUs erstellt. Das aus dem Alignment wurde ein ungewurzelter Baum berechnet, der zeigt, dass die Struktur des Hämocyanins dem „Keyhole limpet Type“ entspricht. Die einzelnen FUs ließen sich FU-a bis FU-h zuordnen (Abbildung 20). Dies zeigt eine größere Ähnlichkeit der Hämocyanin-Sequenz zu Vetigastropoden und Polyplacophoren als eine zu Cephalopoden, da die Hämocyanine der Cephalopoden entweder den Nautilus-Typ oder den Sepia-Typ aufweisen. Im Folgenden wurde dies genauer mithilfe weiterer phylogenetischer Analysen untersucht.

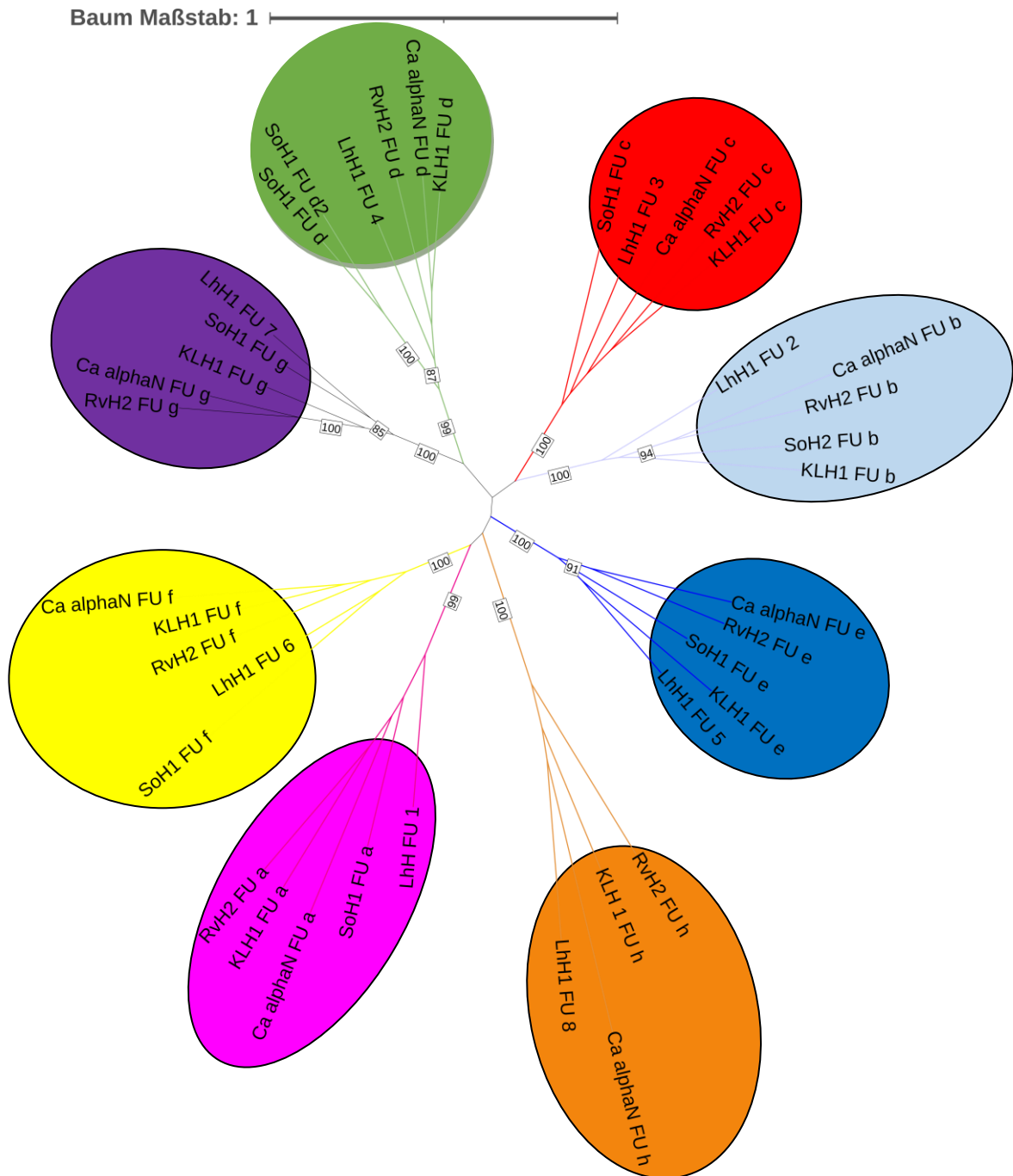


Abbildung 20: Die einzelnen FUs von KLH 1, *R. venosa* h2, *C. aspersum* alphaN, *S. officinalis* h1 und *L. hyalina* wurden als ungewurzelter Baum ((PHYML, LG+G, bootstrap 100), FU-a ist in pink, FU-b in hellblau, FU-c in rot, FU-d in grün, FU-e in dunkelblau, FU-f in gelb, FU-g in schwarz und FU-h in orange) dargestellt. Die FUs von *L. hyalina* wurden entsprechend der Position in der Hämocyanin-Sequenz mit FU 1 bis FU 8 benannt (Darstellung mit iTOL (Letunic und Bork 2024))

Bis dato liegen keine Genomdaten für *L. hyalina* vor, welche Rückschlüsse auf die Exon-Intron-Struktur des Hämocyanins zulassen und eine eingehendere Untersuchung ermöglichen würden. Für keine der 29 weiteren Arten, die den Monoplacophoren zugerechnet werden, liegen weitere Transkriptomdaten (mit Ausnahme von Mitochondriendaten) vor, weshalb ich mich hier auf diese eine Sequenz beschränken musste.

3.1.6. Hämocyanine der Polyplacophora

Bei den untersuchten Transkriptomdaten der Polyplacophoren (16 Arten) wurden insgesamt fünf vollständige Hämocyanin-Sequenzen assembliert (*Acanthochitona rubrolineata*, *Acanthopleura granulata*, *Acanthopleura loochooana*, *Lepidopleurus cajetanus*, *Leptochiton asellus*), wie auch drei Teilsequenzen mit 2.114 bp für *Hanleya hanleyi*, 4.872 bp für *Stenoplax bahamensis* und 3.267 bp für *Chiton olivaceus*. Für Callochitonida lagen zur Zeit der Untersuchung zwei Transkriptome in SRA vor, mit beiden konnten keine Hämocyanin-, Hämoglobin oder Hämyerithrinsequenzen assembliert werden. Für eine Übersicht der Assemblierungsergebnisse siehe Abbildung 21.

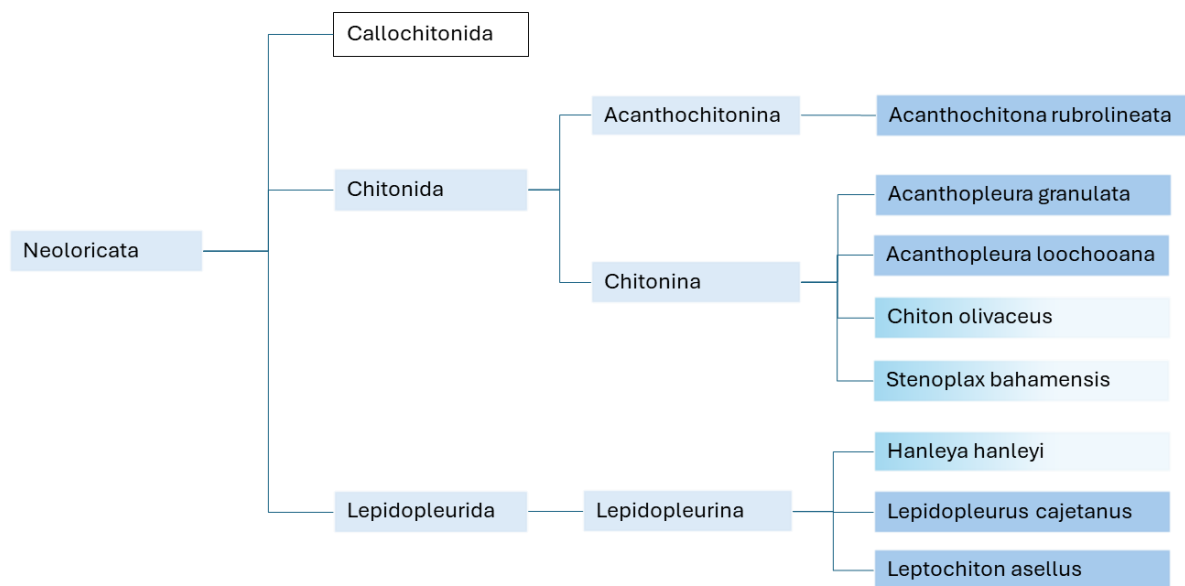


Abbildung 21: Darstellung der Assemblierungsergebnisse für Polyplacophora, vollaufgefüllte Kästchen der Arten entsprechen vollständig assemblierten Hämocyanin-Sequenzen, teilausgefüllte Kästchen der Arten entsprechen teil-assemblierten Hämocyanin-Sequenzen der Neoloricata, weißes Kästchen repräsentiert keine Assemblierungen für Callochitonida.

Nach heutigem Wissensstand wird davon ausgegangen, dass für diese Klasse jeweils nur eine Hämocyanin-Isoform exprimiert wird (Schäfer et al. 2021c; Warnke et al. 2011). In den untersuchten Transkriptomdaten gab es keine Hinweise auf eine zweite Isoform. Insgesamt kann ich feststellen, dass für keine der untersuchten Polyplacophoren Hämoglobin- oder Hämyerithrin-Sequenzen in den Transkriptomdaten gefunden wurde. Es liegen lediglich Genomdaten für *Tonicella lineata*, *Liolophura japonica* und *Acanthopleura granulata* vor. Nur für die letztgenannte Art konnte eine Hämocyanin-Sequenz assembliert werden. Die Blast-Suche des Genoms (GCA_016165875.1) gegen die Hämocyaninsequenz ergab eine Übereinstimmung mit 98 % bis 100 % Identität der Treffer (siehe Supplement). Die alignierten Sequenzbereiche decken die vollständige Hämocyanin-Sequenz einschließlich des Signalpeptides ab. Ich konnte hier die in Abbildung 22 für Chitonida dargestellte Exon-Intron-Struktur der Polyplacophoren-Hämocyanine erkennen. Das Signalpeptid weist ein internes Intron auf, alle FUs sind durch Linker Introns

verbunden und weisen keine weiteren internen Introns auf. Dieser Befund der Blast-Suche deckt sich mit den bereits publizierten Daten.

Beispiele für einige Exon-Intron-Strukturen in den Mollusken-Ordnungen sind grafisch in Abbildung 22 zusammengefasst.

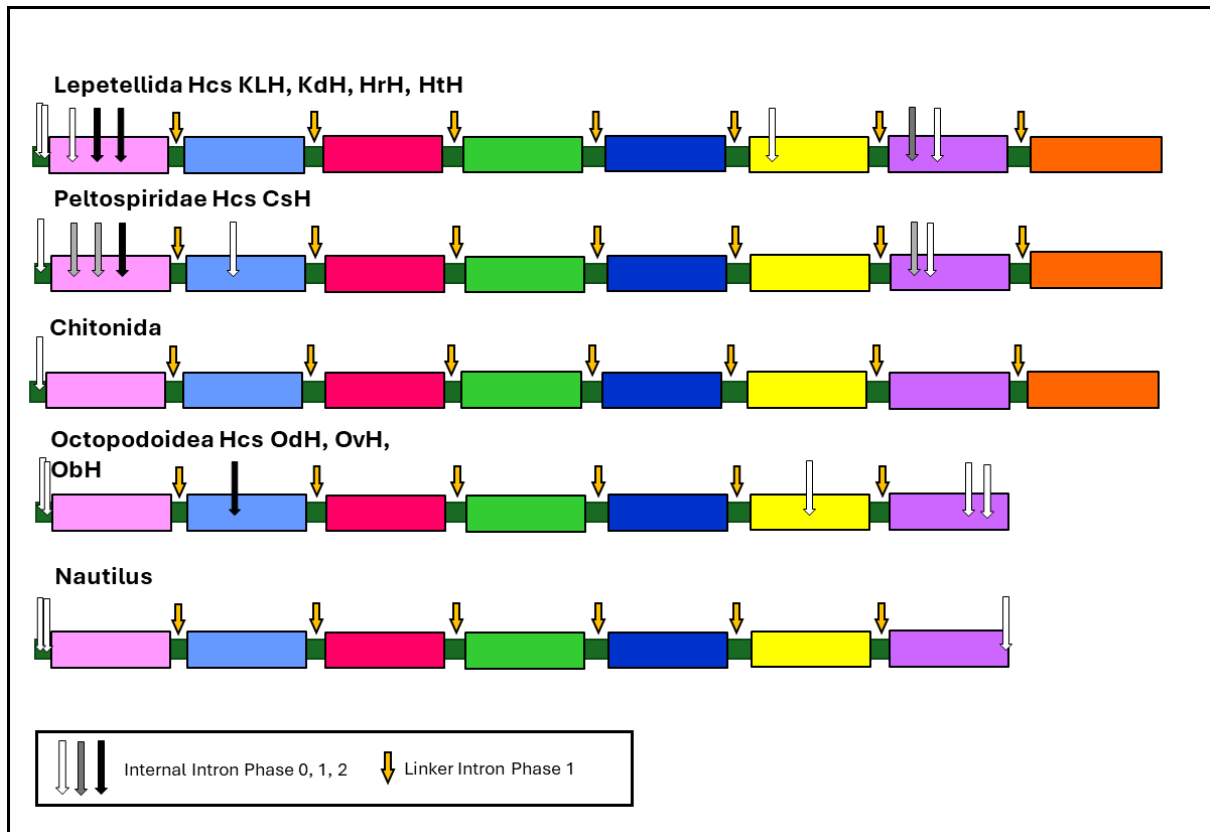


Abbildung 22: Übersicht der Genstruktur der Hämocyanine (Exon-Intron-Struktur) einiger Mollusken: Lepetellida, Peltospiridae, Chitonida, Octopodoidea und Nautilus. Die Hämocyanin-Gen-Struktur ist mit den internen und Linker Introns dargestellt. Die großen Rechtecke stellen die funktionellen Einheiten gemäß dem bekannten Farbschema, FU a bis FU g bzw. FU h dar. Linker Introns (Phase 1) sind mit gelben Pfeilen markiert, interne Introns je nach Phase weiß (Phase 0), grau (Phase 1) und schwarz (Phase 2). Adaptiert nach (Schäfer et al. 2021b)

Für *L. japonica* lässt sich feststellen, dass in den Transkriptomdaten eines ganzen Tieres keine „reads“ für Hämocyanin „mappten“ und somit keine Assemblierung durchgeführt werden konnte. Eine Blast-Suche des Genoms gegen *A. granulata*-Hämocyanin ergab acht Treffer mit einer Identität von min. 85 %. Die Suche deckte die gesamte Abfragesequenz ab, die Treffer deckten sich mit der Länge der einzelnen FUs (siehe Supplement). Es gibt den Hinweis darauf, dass es ein Hämocyanin-Gen in *L. japonica* gibt, ein Transkript aber nicht in den Sequenz-Daten enthalten war.

3.1.7. Untersuchung der Scaphopoda auf respiratorische Proteine

Die untersuchten Daten der sechs Mitglieder der Scaphopoda wiesen in den Transkriptomdaten kein Hämocyanin und Hämoglobin auf. Bei *Entalina tetragona* und *Graptacme eborea* wurden jeweils Hämerythrin-Sequenzen assembliert, 474 bp bzw. 420 bp lang. Für *G. eborea* wurde die Hämerythrin-Sequenz unter KY929238 von Costa-Paiva et al. (2017) bereits publiziert. Die einzigen Genom-Daten lagen für *Siphonodentalium dalli* (GCA_032622095.1) vor. Die Blast-Suche wurde gegen die Hämocyanin-Sequenzen von *A. granulata* und *L. hyelania* ergebnislos durchgeführt. Es gab keine Hinweise in den untersuchten Transkriptom-Daten auf Hämocyanin oder Hämoglobin, jedoch auf Hämerythrin. Die Hämerythrin-Sequenzen wurden nicht weiter untersucht.

3.1.8. Untersuchung der Solenogastres auf respiratorische Proteine

Die Solenogastren sind die achte Klasse der Mollusken. In meiner Arbeit wurden Transkriptomdaten von *E. babai* und *M. fodiens* untersucht, beide zeigten keine Hinweise auf Hämocyanin in ihren Transkriptomdaten, für *M. fodiens* publizierte Costa-Paiva et al. (2017) eine Hämerythrin-Sequenz (KY929250), aus den Transkriptom-Daten ließ sich hier keine Hämerythrin-Sequenz assemblieren.

Für die phylogenetische Untersuchung der Hämocyanin-Transkriptome bedeutete dies, dass die Klassen Caudofoveata, Scaphopoda und Solenogastres nicht eingeschlossen werden konnten.

3.1.9. Phylogenie der Hämocyanine der Mollusken

Nach der Untersuchung der Hämocyanine der Gastropoden wurden die orthologer Sequenzabschnitte der Hämocyanine der Mollusken verglichen. Dies entspricht der Nomenklatur folgend der FU-b bis FU-g. Ein Phylogramm mit 46 Sequenzen und dem Substitutionsmodell WAG+G+I+F wurde konstruiert (Abbildung 23). Hier bildeten die Hämocyanine der Caenogastropoda das Schwestertaxon zu den Hämocyaninen der Heterobranchia mit einem Bootstrap-Wert von 100. Zu diesem Ast bilden Vetigastropoden-Hämocyanine und Neomphaliones-Hämocyanine das Schwestertaxon. Die Hämocyanine der Protobranchia sind zu beiden das Schwestertaxon. Hierzu bilden Hämocyanine der Monoplacophora und Polyplacophora das Schwestertaxon, wobei die Verzweigung der Monoplacophora-Hämocyanine nur mit einem niedrigen Bootstrap-Wert (58) unterstützt wird. Die Cephalopoden-Hämocyanine sind mit einer frühen Divergenz der Nautiloidea Schwester zu allen anderen Mollusken-Hämocyaninen. Mit

robusten Bootstrapwerten zeigte sich die Verwandtschaft von Neomphaliones und Vetigastropoden auf Basis der Hämocyanine, innerhalb der Vetigastropoden ist die Dichotomie von den Isoformen KLH 2, HoH 1, PH 1 und HrH 2, HdH 2 wenig unterstützt, sie divergiert in Hämocyanine der Haliotidae und Fissurilidae mit einem Bootstrapwert von 56. Bei den Heterobranchia-Hämocyaninen ist die Verwandtschaft zwischen AcH 1 und LsH 1 nur wenig unterstützt (Bootstrap-Wert von 53). Auf Duplikationsevents bei Heterobranchia-Hämocyaningene kann aus diesem Phylogramm nicht geschlossen werden, da nicht alle Isoformen der verschiedenen Spezies eingeschlossen wurden. Somit würde die Anzahl der möglichen Duplikationsevents zu gering angegeben sein.

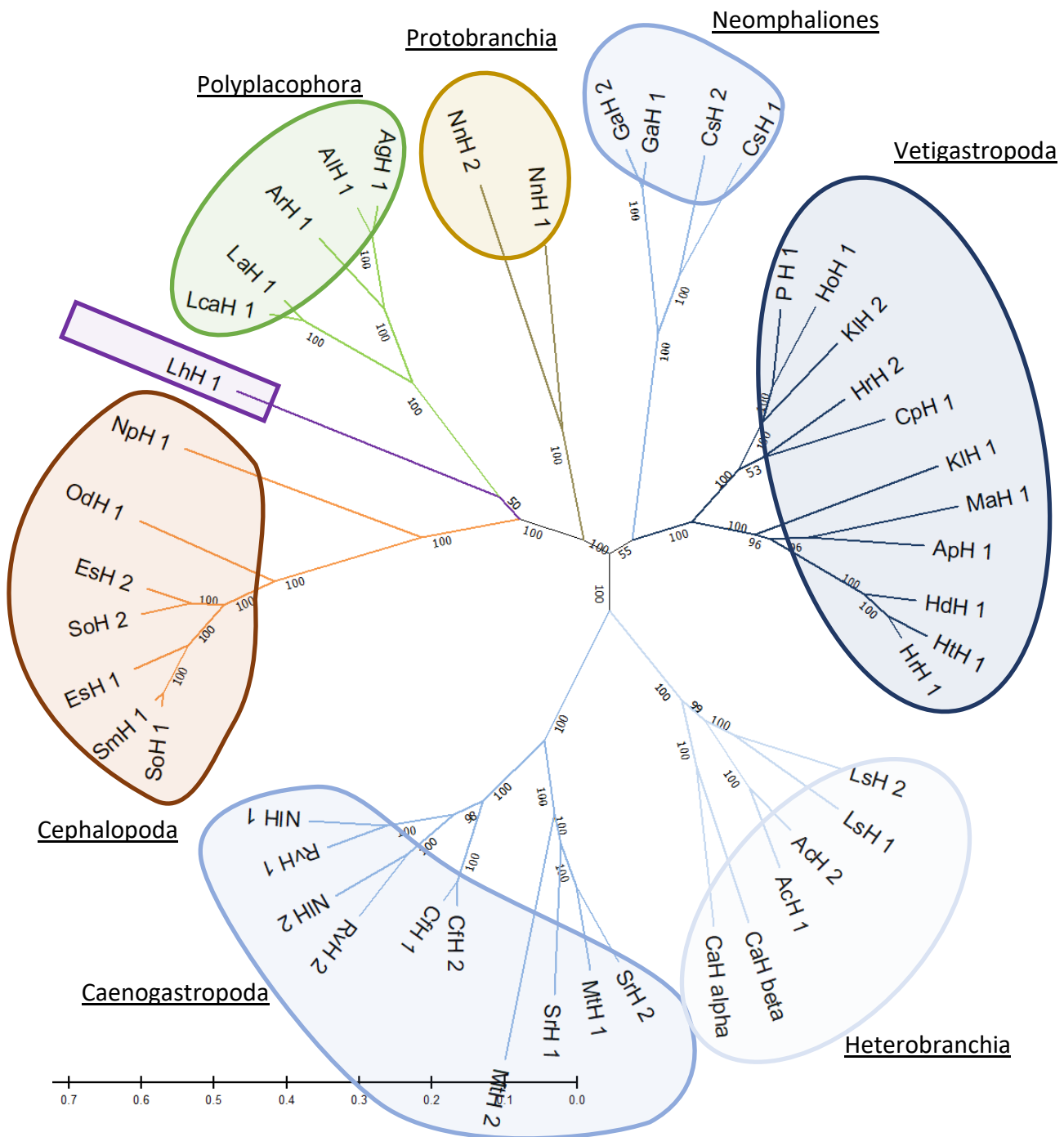


Abbildung 23: Evolutionsanalyse mit der Maximum-Likelihood-Methode in MEGAX: Die Evolutionsgeschichte wurde mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode und dem Modell von Whelan und Goldman + Freq. abgeleitet [1]. Dargestellt ist der Baum mit der höchsten logarithmischen Wahrscheinlichkeit (-109976.97). Der prozentuale Anteil der Bäume, in denen die zugehörigen Taxa geclustert sind, ist neben den Zweigen angegeben. Die Ausgangsbäume für die heuristische Suche wurden automatisch ermittelt, indem die Algorithmen Neighbor-Join und BioNJ auf eine Matrix paarweiser Abstände angewandt wurden, die mit dem JTT-Modell geschätzt wurden, und dann die Topologie mit dem höchsten log-Likelihood-Wert ausgewählt wurde. Eine diskrete Gamma-Verteilung wurde verwendet, um Unterschiede in der Evolutionsrate zwischen den Standorten zu modellieren (5 Kategorien (+G, Parameter = 1.3003)). Das Modell der Ratenvariation ermöglichte es, dass einige Standorte evolutionär unveränderlich sind ([+], 9.61% der Standorte). Der Baum ist maßstabsgetreu gezeichnet, wobei die Zweiglängen in der Anzahl der Substitutionen pro Standort gemessen werden. Der Anteil der Stellen, an denen mindestens eine eindeutige Base in mindestens einer Sequenz für jede absteigende Klade vorhanden ist, wird neben jedem internen Knoten im Baum angezeigt. Diese Analyse umfasste 46 Aminosäuresequenzen. Die kodierenden Daten wurden unter der Annahme einer N/A genetischen Codetabelle übersetzt. Der endgültige Datensatz enthielt insgesamt 2926 Positionen. Die evolutionären Analysen wurden in MEGA X [2] durchgeführt. 1. Whelan und Goldman (2001), Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018), Felsenstein (1985).

Um einen Vergleich zu den Ferritin-Sequenzen, die im Rahmen der Arbeit ebenso assembliert und aligniert wurden zu ziehen, wurden statistische Werte wie Mittelwert und Standardabweichung herangezogen und im Folgenden verglichen und diskutiert. Die statistische Auswertung der Distanzmatrix mit der Identität in % erfolgte hier analog zur den Gastropoden-Hämocyanin-Sequenzen (Diagramm 4).

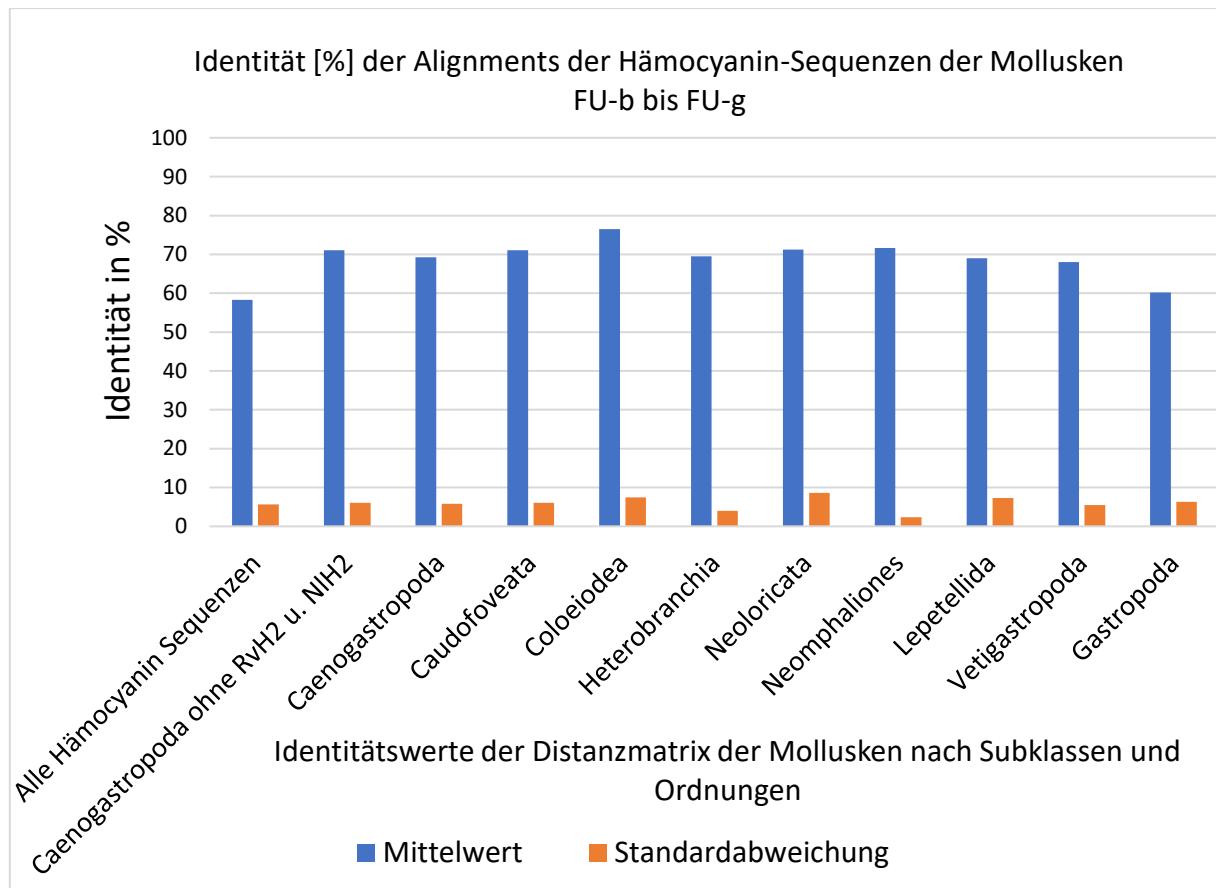


Diagramm 4: Auswertung der Distanzmatrices der Identität in % aus den Geneious® MUSCLE Alignments mit allen Mollusken-Hämocyaninen mit dem Sequenzbereich FU b bis FU g mit Mittelwert und Standardabweichung der Identitätswerte innerhalb der Klassen der Mollusken und der Subklassen und teilweise den Ordnungen der Gastropoden

Zur eingehenden Betrachtung der Identitäten der Hämocyanin-Sequenzen in Bezug auf alle hier untersuchten Mollusken ist festzustellen, dass der Mittelwert der Identität in % für alle Mollusken-Hämocyanine zusammen bei 58 % lag, für Gastropoden-Hämocyanine bei 60% und für alle anderen Hämocyanin-Alignments der Subklassen zwischen 68 % und 79 % lag. Die Standardabweichung schwankte zwischen 4 und 12, betrug in fünf von 11 Fällen 6. Der geringste Wert für die Identität betrug bei allen Mollusken 45 %, sonst 48 % (Gastropoden) und höchstens 70 % (Neomphaliones). Die maximalen Identitätswerte lagen zwischen 97 % (Molluska und Gastropoda) und 83 % bei Heterobranchia. Die Vergleiche der Identitätswerte gaben Auskunft über die Identität der Hämocyanin-Sequenzen und wurden mit denen der Ferritine verglichen. Jedoch waren die Werte durch die Wahl der alignierten Sequenzen beeinflussbar und die Einbeziehung von stark

abweichenden Sequenzen, wie die von *R. venosa* oder *C. squamiferum* beeinflusste die Identitätswerte entsprechend stark in diesen Alignments.

3.2. Ergebnisse der Ferritin Analyse

Die Alignments und Phylogramme der Ferritine beinhalten insgesamt 98 Sequenzen, die hier näher analysiert wurden (Übersicht siehe Anhang Tabelle 13). Aus dem ersten Alignment in Geneious® mit MUSCLE zeigte sich, dass einige Ferritin-Sequenzen deutlich weniger Identität mit den übrigen Sequenzen aufwiesen, dazu gehörten die Sequenzen von *L. japonica*, *P. fucata ferritin-like*, *S. inermis* und *A. rubrolineata*. Die Ergebnisse der Alignments (Distanzmatrices sind im Supplement hinterlegt) und die statistische Analyse wurden in Diagramm 5 und Diagramm 6 zusammengefasst. In der Distanzmatrix der 98 Ferritin-Sequenzen aller Spezies zeigte sich, dass Spezies, die demselben Genus angehörten in den meisten Fällen die höchste Identität der Ferritin Sequenzen zueinander haben, Haliotis 93 % - 98 %, Argopecten 93 %, Acanthopleura 90 %, Neotrigonia 96 %, innerhalb des Genus Falcidens hatten die Ferritin-Sequenzen lediglich 70 % Identität zueinander. *C. eremineus* hatte 99 % bzw. 100 % Identität zu den anderen Mitgliedern desselben Genus mit *C. ebraeus* und *C. frigidus*. *C. ebraeus* und *C. frigidus* hatten dagegen eine Identität der Ferritin-Sequenzen von 97 %. Die Ferritin-Sequenz von *L. japonica* (Polyplacophora, Chitonidae) zeigte durchgehend geringe Identitäts-Werte zu allen anderen Sequenzen (ca. 40-50 % Identität). Die Identitätswerte der Distanzmatrix mit allen Ferritin-Sequenzen lag bei 90,8 % der Werte zwischen 60-80 %. Bei den Autobranchia, mit 17 Spezies, war der niedrigste Wert 60 %, der höchste von *Pinctada fucata-ferritin like* und *P. imbricata* lag bei 81 %. Aus der Klasse der Heterobranchia mit vier Arten (von diesen gehörte keine zum selben Genus) lagen die Identitäts-Werte zwischen 73 % und 77 %. Für Protobranchia wurde von einer Art eine Ferritin-Sequenz in dem Alignment eingeschlossen und die Identitäts-Werte zu allen anderen Ferritin-Sequenzen lagen zwischen 60 % und 70 %, mit dem Höchstwert von 88 % zu *G. tolmiei* Ferritin. Aus der Klasse der Gastropoden wurden Caenogastropoda, Neomphaliones und Vetigastropoda Ferritin-Sequenzen in die Analyse eingeschlossen. Die Caenogastropoden mit 3 Genera und 5 Spezies zeigten Identitäten von 61 % bis 85 %, innerhalb eines Genus bis zu 100 %. Die Vetigastropoda mit insgesamt 37 Spezies in 33 Genera bildeten die größte Gruppe der hier untersuchten Ferritin-Sequenzen. Die Identitäten lagen bei 75 % der Werte zwischen 80 % und 88 %. Die beiden Neomphaliones-Ferritine hatten zueinander 80 % Identität, zu allen anderen Ferritin-Sequenzen 60 % bis 80 % Identität. Da *L. japonica* eine deutlich andere Primär-Struktur in der Ferritin-Sequenz aufwies, wurde diese im Folgenden explizit betrachtet.

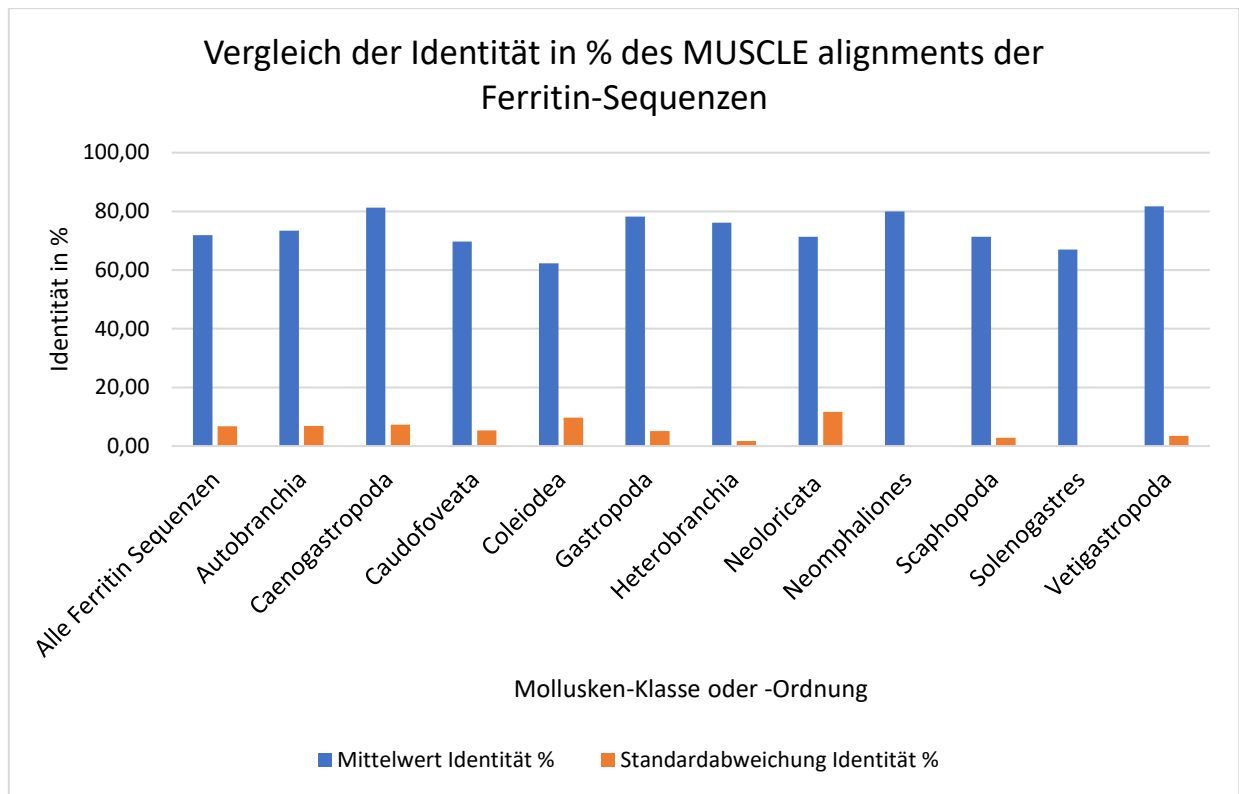


Diagramm 5: Vergleichende Analyse der Identitätswerte der Alignments in Geneious mit MUSCLE (Standardparameter) der Ferritin-Sequenzen der Mollusken mit Klassen und Ordnungen mit Mittelwerten (blau) und Standardabweichung (orange)

Die statistische Auswertung der Distanzmatrizes aller Ferritin-Sequenzen ohne *L. japonica* zeigt Diagramm 6. Es war zu erkennen, dass die Ferritin-Sequenz von *L. japonica* die Identitäts-Werte des Alignments der Neoloricata-Ferritine beeinflusste, mit der Ferritin-Sequenz von *L. japonica* betrug der Mittelwert 71 % und die Standardabweichung 12 %, ohne die Ferritin-Sequenz im Alignment betrug der Mittelwert 75 % und die Standardabweichung 7 %. In Betracht wurde gezogen, dass *L. stagnalis* ein zweites Ferritin im Dotter (X56779.1) exprimiert, auch bei anderen Spezies können mehrere Ferritine gleichzeitig oder zu wechselnden Entwicklungsstadien exprimiert werden. Hier wurde für *S. inermis* eine deutlich unterschiedlich lange Ferritinsequenz (609 bp) zur bereits publizierten (JX401574.1, 516 bp) assembliert. Eine Schwierigkeit in der Bewertung der Ergebnisse liegt darin, dass oftmals gerade bei älteren Sequenzdaten keine vollständigen Angaben zur Quelle gemacht werden, was für JX401574.1 zutrif. Es ist nicht nachzuvollziehen, ob es sich um ein Individuum oder eine gepoolte Probe handelte und in welchem Entwicklungsstadium die Probe genommen wurden. Es fehlten hier entscheidende Informationen zur weiteren Auswertung dieses Ergebnisses.

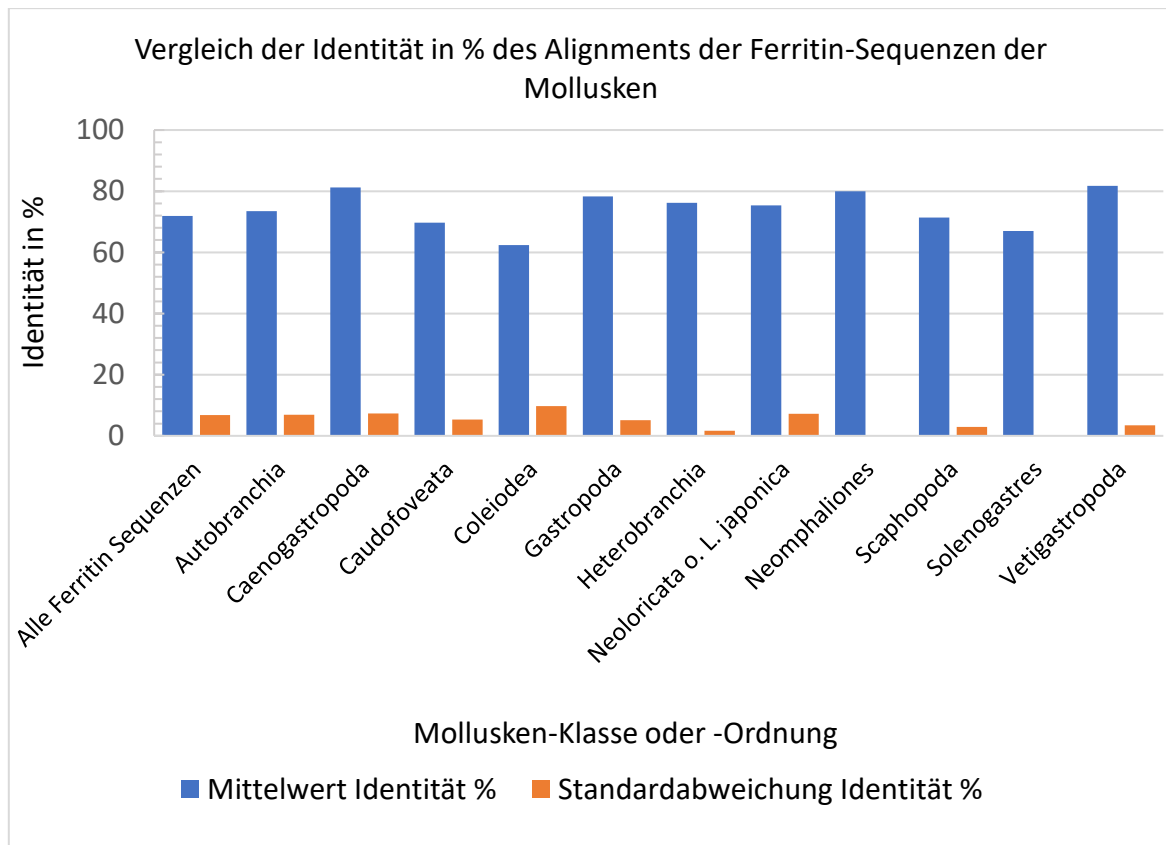


Diagramm 6: Identitätswerte in % der Ferritin-Alignments der Ferritine aller Mollusken mit 98 Sequenzen in Geneious® mit MUSCLE und Standardeinstellungen durchgeführt. Alignments wurden mit allen Klassen und Ordnungen erstellt und die Mittelwerte und Standardabweichungen verglichen.

Die Standardabweichung der Identität der Ferritin-Sequenzen betrug bei Heterobranchia 2 % und hatte bei Neoloricata den höchsten Wert mit 12 %. Wurde *L. japonica* aus dem Ergebnis entfernt, so lag die Standardabweichung nur noch bei 7 %. Damit erreichten Coleoidea mit 10 % die höchste Standardabweichung, generell lag die Standardabweichung zwischen 2 % und 7 %. Die Mittelwerte der Identität lagen zwischen 62 % (Coleoidea) und 82 % (Vetigastropoda).

Um eine weitere Einschätzung der Struktur der Ferritin-Sequenzen und Hinweise auf Gemeinsamkeiten zu ermitteln, wurden für alle Klassen der Median und der gewichtete Mittelwert der Sequenz-Längen der ORFs in bp ermittelt, da bei einigen Subklassen die Sequenzlängen bei gleichzeitig wenigen untersuchten Sequenzen sehr unterschiedlich waren (Bsp. Coleoidea). Monoplacophora, Nautiloidea, Protobranchia, Neomphaliones, Scaphopoda und Trochida wiesen einen Median und einen Mittelwert unter 520 bp Länge (ORF) auf. Sieben von insgesamt 17 gewichteten Mittelwerten liegen zwischen 520 bp und 530 bp und Coleoidea (548 bp), Chitonida (541 bp) und Lepidopleurida (543 bp, beide Polyplacophoren) haben deutlich längere ORFs der Ferritin-Sequenzen im Mittel.

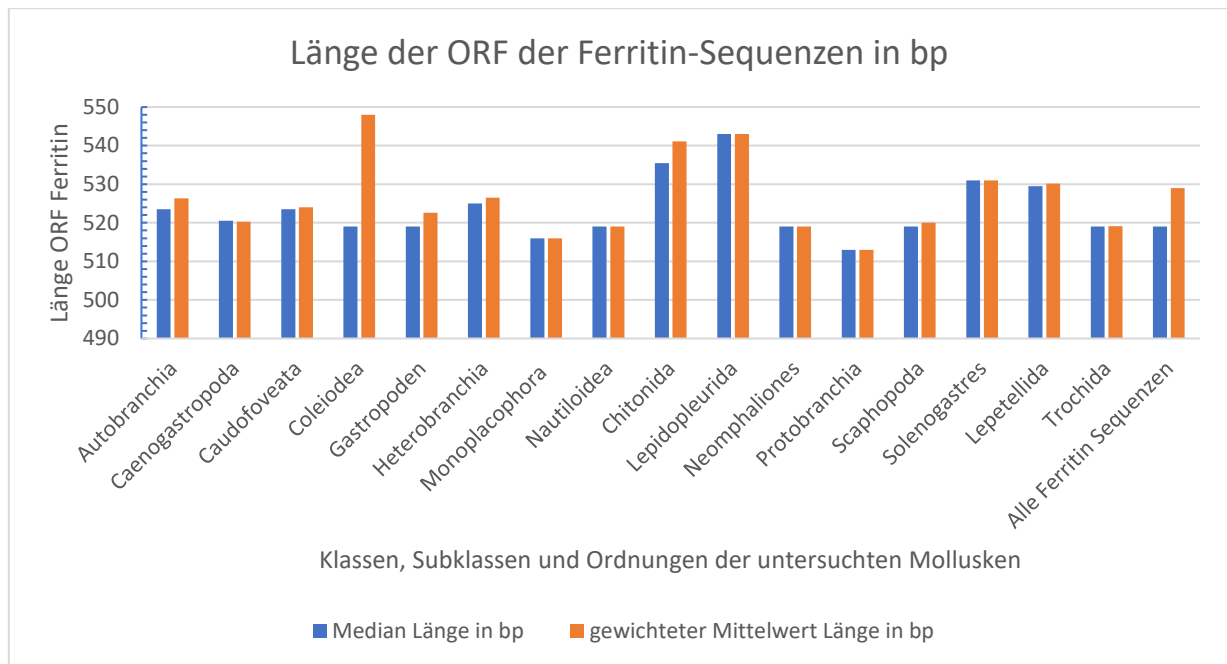


Diagramm 7: Vergleich der ORF-Länge in bp der Ferritin-Sequenzen aller Klassen und Subklassen der Mollusken mit den Medianen und gewichteten Mittelwerten aus den Alignments mit Geneious R9® MUSCLE mit Standardparametern.

Im Alignment mit allen Ferritin-Sequenzen der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen zeigte sich, dass *L. japonica* in der Mitte der Sequenz einen 11 (THR101 bis GLU111) und 25 (ALA115 bis ALA139, insgesamt 36 AS) AS langen Bereich aufweist, der bei keiner anderen Sequenz vorhanden ist. Die sieben AS, die mit dem Ferroxidase-Zentrum korrespondieren, sind in Abbildung 24 mit den roten Boxen markiert.

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 291

Myochema anomioides Ferritin
 Arca nose Ferritin
 Scrobicollia plepa Ferritin
 Astarte sulcata Ferritin
 Mytilus virgata Ferritin
 Pinctada lucida Ferritin-like
 Pinctada mazatlanica Ferritin
 Margarinifer margarifera Ferritin
 Argopecten iradians Irradians Ferritin
 Argopecten purpuratus Ferritin 2
 Neogibberia imariculi Ferritin
 Neogibberia imariculi Ferritin
 Megalobala nervosa Ferritin
 Potamilus streckeri Ferritin
 Cristaria plicata Ferritin
 Cristaria plicata Ferritin
 Radixes phiboceras Ferritin
 Semisulcosa rufina Ferritin
 Copania venosa Ferritin
 Nucella lapillus Ferritin
 Conus emineus Ferritin
 Falsodidoma nidulum Ferritin
 Falsodidoma nidulum Ferritin
 Scaphodroma clenchii Ferritin
 Scaphodroma clenchii Ferritin
 Falciolens caudatus Ferritin
 Rochadidoma californicum Ferritin
 Sepia officinalis Ferritin
 Sepia officinalis Ferritin
 Aplysia californica Ferritin
 Aplysia californica Ferritin
 Tritonia stagnalis Ferritin
 Comu essersum Ferritin
 Laeoplinea hyalina Ferritin
 Nematocystis Ferritin
 Tonleuca meata Ferritin
 Chiton olivaceus Ferritin
 Stenoplex bahamensis Ferritin
 Acanthopleura granulata Ferritin
 Acanthopleura granulata Ferritin
 Calochiton Ferritin
 Choneplax lata Ferritin
 Acanthochiton rubroleata Ferritin
 Jochopora japonica Ferritin
 Jochopora japonica Ferritin
 Lepidochiton seelus Ferritin
 Lepidopleurus caelestis Ferritin
 Chrysomallon squamiferum Ferritin
 Gigantopoda beigi Ferritin
 Gigantopoda beigi Ferritin
 Graebacme eborae Ferritin
 Antalis erialis Ferritin
 Gaidia tonnei Ferritin
 Elicona lutea Ferritin
 Elicona lutea Ferritin
 Haliotis tuberculata Ferritin
 Pyropelta Ferritin
 Lepidochiton pustulosus Ferritin
 Lepidochiton pustulosus Ferritin
 Fissurella nodosa Ferritin
 Fissurella nodosa Ferritin
 Diodora listeri Ferritin
 Lucapina suffusa Ferritin
 Puncturella Ferritin
 Puncturella Ferritin
 Monfortula rugosa Ferritin
 Emarginula Ferritin
 Haliotis discus hamai Ferritin
 Haliotis rufescens Ferritin
 Haliotis rufescens Ferritin
 Maragala rufellens Ferritin
 Mundella ammonoceras Ferritin
 Turbo aggrostomus Ferritin
 Turbaniplicata Ferritin
 Turbaniplicata Ferritin
 Angaria nodosa Ferritin
 Cantranea nucleata Ferritin
 Lotina semicitharata Ferritin
 Lotina semicitharata Ferritin
 Tegula fasciata Ferritin
 Arca cruentata Ferritin
 Astralium Ferritin
 Lunella coronata Ferritin
 Lunella coronata Ferritin
 Eur-Archiochloa conopsea Ferritin
 Austrochloa porcata Ferritin
 Cartharius japonicus Ferritin
 Trochus maculatus Ferritin
 Trochus maculatus Ferritin
 Komatichus sanguinea Ferritin
 Komatichus Ferritin
 Marevallata tricornata Ferritin
 Bdrhopoma pilula Ferritin

Abbildung 24: Geneious® mit ClustalW, AS Alignment der Ferritin-Sequenzen mit Blossum 62 Farbschema: grün entspricht 100 Identität in allen Ferritin-Sequenzen, hellgrün 100-80, gelb 60-80 und weiß unter 60 Identität

Für *L. japonica* wird im Alignment eine Insertion dargestellt, die in keiner weiteren Ferritin-Sequenz enthalten ist, mit Ausnahme des Motivs KKP, türkis in der folgenden Primärstruktur der Insertion hervorgehoben.

Insertion: TYKDVCDKINE **KKP** AELSSACICEFTA AATGGDPSSCSA

Aus der vollständigen AS-Sequenz des Monomers wurde bereits eine 3D-Struktur mit AlphaFold (Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2022) modelliert und unter der Acc. Nummer O15972 in UniProt (uniprot.org) hinterlegt. Die 3D Darstellung des *L. japonica* Ferritin-Monomers in Abbildung 25 zeigt die Insertion in der Mitte des Monomers beginnend mit THR101 (siehe schwarzer Pfeil rechts) und endet in dem orangen Bereich mit ALA139 (schwarzer Pfeil links). Die Farbgebung korrespondiert mit dem Konfidenz-Niveau in AlphaFold siehe Legende in Abbildung 25.

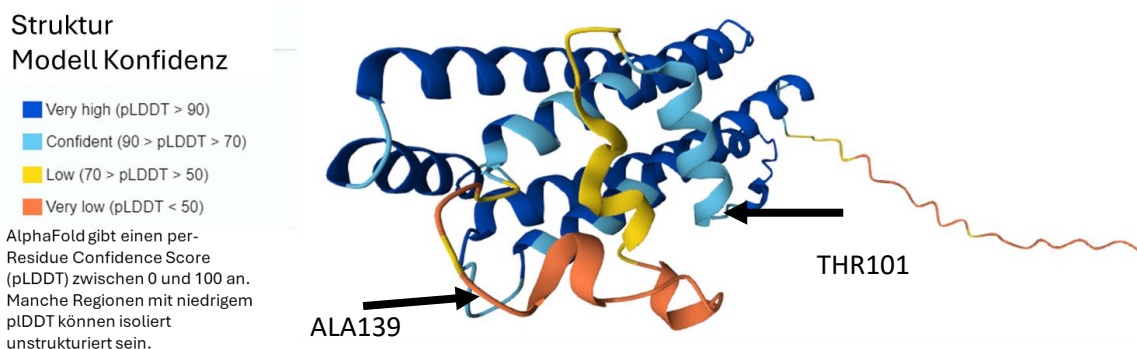


Abbildung 25: 3D-Darstellung von *Liolophura japonica* Ferritin-Monomer aus uniProt O15972 · O15972_LIOJA (UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023 2023; Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2022)

Aus der Darstellung wird deutlich, dass die 3D-Struktur der Insertion mit einem niedrigen Konfidenz-Niveau dargestellt ist und folglich nicht aufgelöst wurde. Im Vergleich zur *L. japonica* Ferritin-Monomer-Struktur ist in Abbildung 26 die Struktur des Ferritin-Monomers von *Crassostrea gigas* dargestellt, welche mit dem Konfidenzniveau „very high“ ebenso mit AlphaFold berechnet wurde.

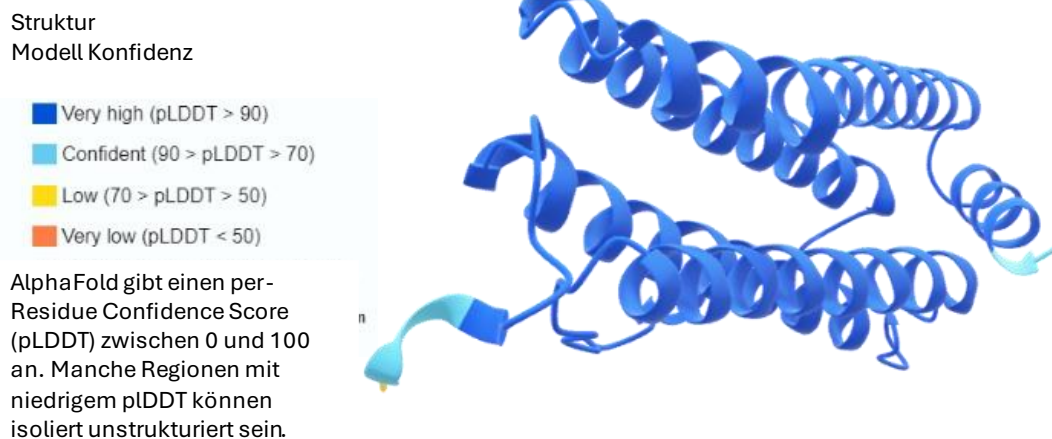


Abbildung 26: Bändermodell eines Ferritin-Monomers von *Crassostrea gigas* (uniProt Accession-Nummer: Q2PDG9) unterAngabe des Konfidenz-Niveaus der Modellierung mit AlphaFold

Dieses Ferritin-Monomer mit einer Aminosäuren-Sequenz von 171 AS entspricht der Länge von 80 Ferritin-Sequenzen der 98 eingeschlossenen Ferritin-Sequenzen in meiner Studie und repräsentiert die 3D-Struktur stellvertretend für diese Sequenzen.

Nach der Analyse der Alignments der Hämocyanin- und Ferritin-Sequenzen wurden die erhobenen Mittelwerte und die Standardabweichungen der Identität für vergleichbar repräsentierte Klassen und Unterklassen in Diagramm 8 gegenübergestellt. In allen Fällen bis auf in Caudofoveata und Coleioidea ist der Mittelwert der Identität für Ferritin-Sequenzen höher als der entsprechende Mittelwert der Hämocyanin-Sequenzen, für Neoloricata sind beide Werte mit 71 % gleich hoch. Wohingegen die Standardabweichung in fünf Fällen für die Hämocyanin-Sequenzen (Caudofoveata, Gastropoda, Heterobranchia, Lepetellida und Vetigastropoda) geringer ist.

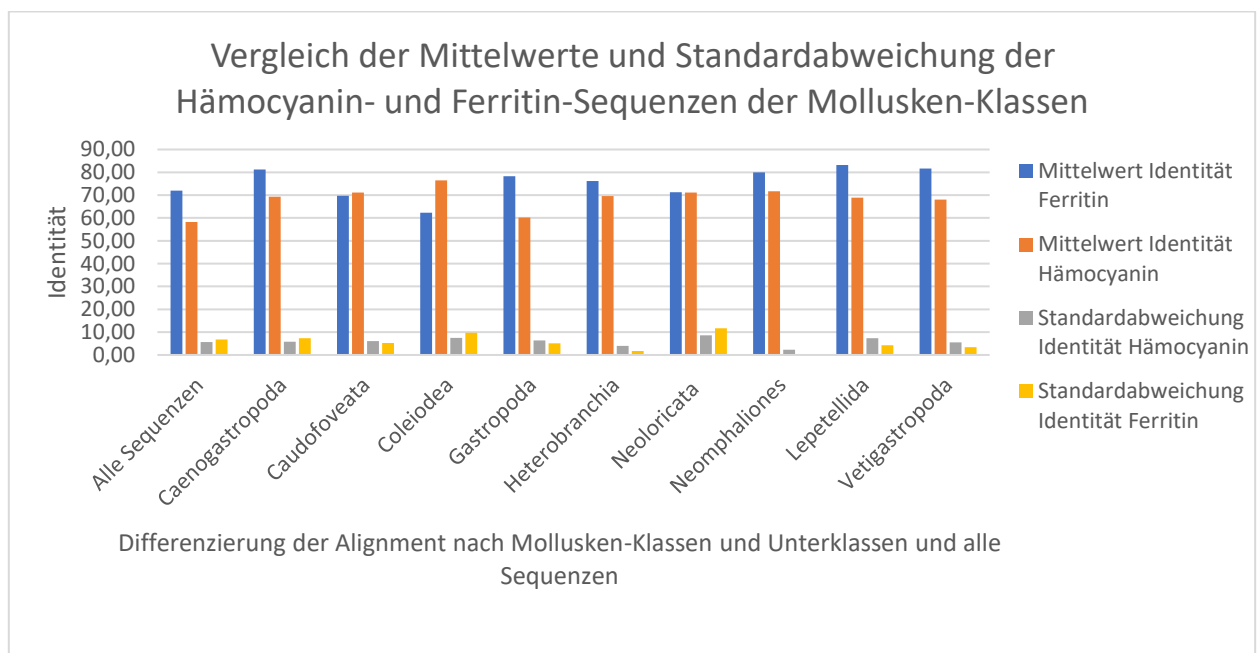


Diagramm 8: Ferritin und Hämocyanin Mittelwert und Standardabweichung aller untersuchten Sequenzen und nach Mollusken-Klassen und Unterklassen getrennt

Hämocyanin-Sequenzen weisen im Phylum Mollusca eine geringere Identität auf als vergleichbare Ferritin-Sequenzen, wobei die Abweichung der Werte in fünf Fällen für die Hämocyanine geringer ist.

3.2.1. Phylogenie der Ferritine der Mollusken

Für die Rekonstruktion der Phylogenie der Mollusken-Ferritine wurde ein Phylogramm mit dem Evolutionsmodell LG+G berechnet (siehe nächste Seite). Insgesamt ist zu bemerken, dass nur 12 Verzweigungen auf Art-Niveau mit Bootstrap-Werten über 90 berechnet wurden.

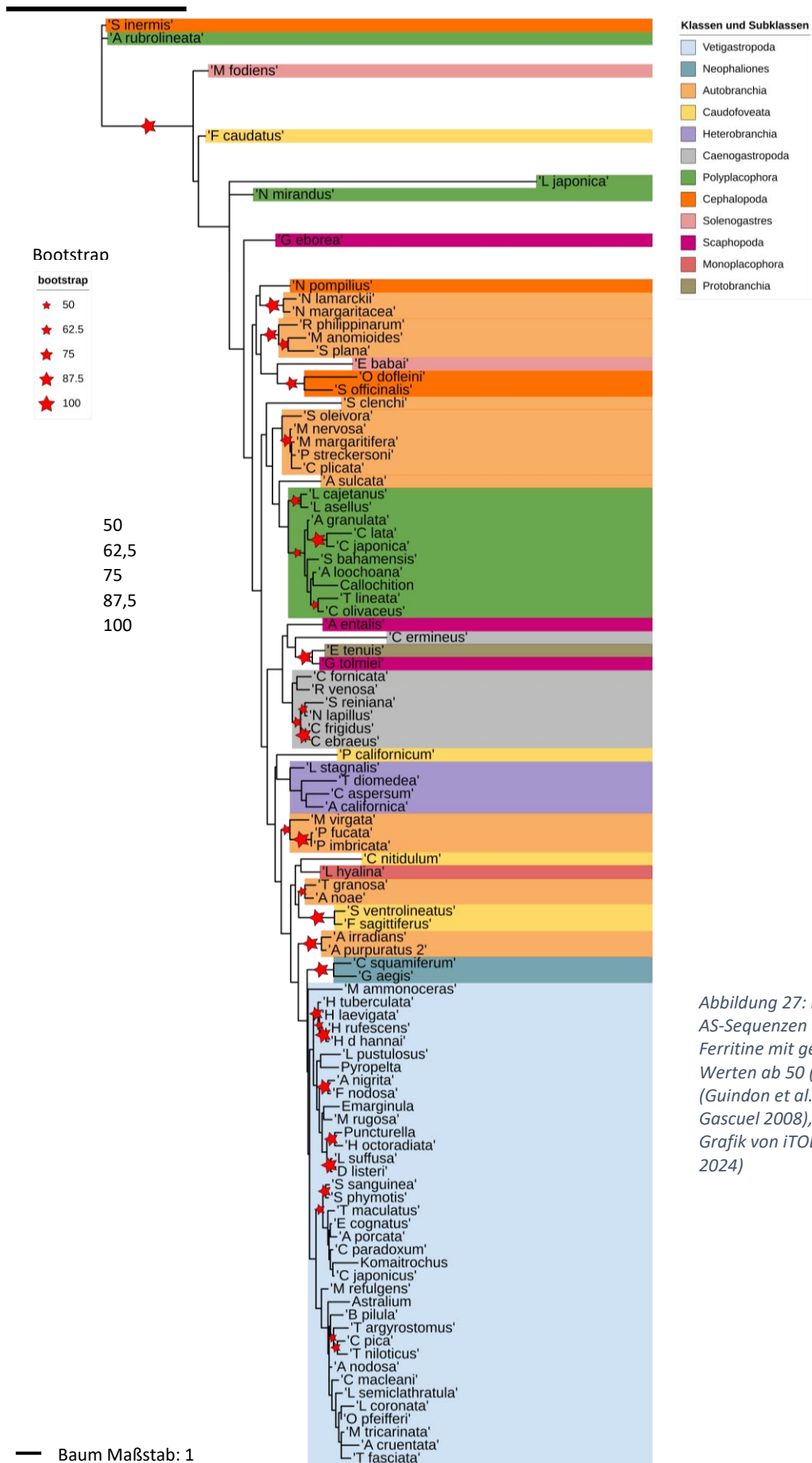


Abbildung 27: Phylogramm der 98 AS-Sequenzen der Mollusken-Ferritine mit gezeigten Bootstrap-Werten ab 50 (Geneious® PhyML (Guindon et al. 2010), LG+G (Le und Gascuel 2008), Standard-Parameter, Grafik von iTOL (Letunic und Bork 2024))

Das Phylogramm (Abbildung 27) zeigt, dass eine Rekonstruktion der Phylogenie mittels der Ferritin-Sequenzen keine Auflösung der Verwandtschaft in dieser Matrix ermöglichte. Die Mollusken-Klassen wurden auf verschiedenen Ästen positioniert. Versuche weitere Isoformen aus den Rohdaten der Transkriptome zu assemblieren blieben erfolglos.

4. Diskussion

4.1. Hämocyanine der Mollusken

Hämocyanine der Peltospiridae – ein neuer Hämocyanin-Typ

Der Vergleich der *de novo* assemblierten Transkriptom-Sequenzen der Peltospiridae mit den jeweiligen Referenz-Genomen, zeigte dass es sich bei den beiden Isoformen der beiden Spezies um zwei paraloge Hämocyanin-Gene handelt. Die cDNA-Sequenzen unterscheiden sich um ca. 3.750 bp in ihrer Länge. In der Verwandtschaftsbeziehung von *Gigantopelta* ist ursprünglich der Genus *Peltospira* das Schwestertaxon und *C. squamiferum* wiederum als Schwester zu allen Peltospiridae postuliert worden (Chen et al. 2017a). Neue mitogenomische Analysen enthielten Daten von weiteren Peltospiridae und setzten statt *Peltospira* den monotypischen Genus *Dracogyra* (*subfusca*) als Schwestertaxon zu *G. aegis* wie in Abbildung 28 dargestellt (Zhang et al. 2024; Zhong et al. 2022).

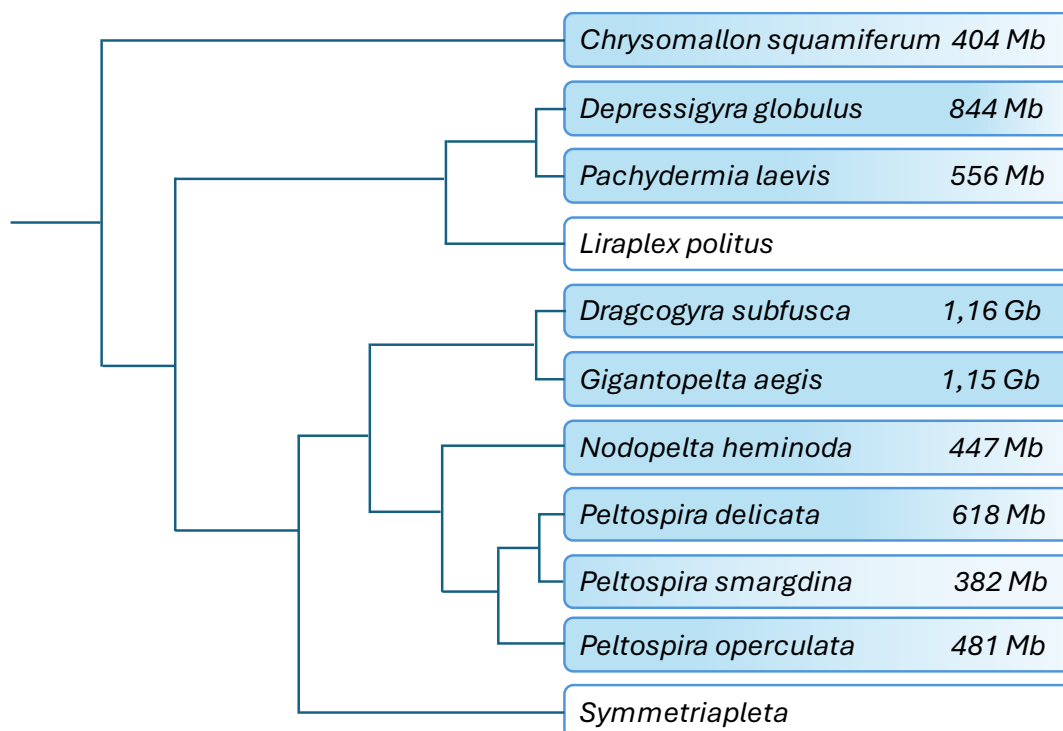


Abbildung 28: Phylogenie und Genomgröße der Peltospiridae nach „NCBI Genome“, wobei die Füllung der Kästen die Genom-Größe widerspiegelt, weiße Kästchen stehen dafür, dass keine Genomdaten vorliegen, das Kladogramm basiert auf Zhang et al. (2024)

Zhang et al. (2024) vermuten, dass die Besiedlung des indischen Ozeans von den Peltospiridae dreimal erfolgte, zuerst von *C. squamiferum*, gefolgt von *G. aegis* und *Dracogyra subfusca*, und dann von *Liraplex politus*. Von den insgesamt 27 Arten der Peltospiridae (W.O.R.M.S) sind lediglich von 11 Arten Genome sequenziert worden, somit kann die Verwandtschaftsbeziehungen dieser Spezies innerhalb der Familie nicht sicher aufgelöst werden. Bekannt ist, dass die Genomgröße sich innerhalb der Peltospiridae deutlich unterscheidet, aber die mögliche Relevanz in der Phylogenese ist nicht bekannt. Der hier neue postulierte Hämocyanin-Typ könnte auch in weiteren Ordnungen evolviert sein, was aber mit den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden kann. Im Kontext der Hämocyanin-Gene der beiden Peltospiridae könnte die Abstammung von einem gemeinsamen Vorfahren der Grund für die gleiche Gen-Struktur sein, und wurde in diesem Fall vom letzten gemeinsamen Vorfahren von *C. squamiferum* und *G. aegis* vererbt. Diese These würde durch die Tatsache unterstützt, dass dieser Hämocyanin-Typ auch bei den anderen Peltospiridae zu finden wäre, die nicht im indischen Ozean leben und näher mit *G. aegis* verwandt sind. Auch eine parallele Entwicklung der Hämocyanine aufgrund des gemeinsamen Habitats und die notwendigen Adaptationen kommt in Betracht (Rondón et al. 2024; Chen et al. 2017a; Chen et al. 2015b; Lan et al. 2021). Viele Tiefsee-Organismen leben symbiontisch, diese Arten beherbergen die Endosymbionten jedoch meist in den Kiemen (Stein et al. 1988; Breusing et al. 2022). Möglicherweise geht die Modifikation der Hämocyanine durch die Triplikation einer FU, wie auch die Ausbildung einer hypertrophierten Oesophagus Drüse (Sasaki et al. 2010), auf die Adaptation an das Habitat zurück (Rogers et al. 2012; Lan et al. 2021; Lan et al. 2022). Welche physiologischen Vorteile ein verändertes Hämocyanin diesen Arten bringt, muss noch untersucht werden, es ist aber sicher, dass die 3D-Struktur dieses neuen Hämocyanin-Typus von den bekannten Strukturen der Hämocyanine abweicht. Mögliche Strukturen könnten sein, dass die zusätzlichen FU-c in den Innenraum des Zylinders reichen, ähnlich des Sepia-Typen (Miller et al. 1990) oder des Mega-Hämocyanin-Typen (Lieb et al. 2010). Neben der erhöhten Sauerstofftransportkapazität oder Sauerstoffaffinität (Lieb et al. 2010; Terwilliger 1998a; van Holde und Miller 1995) kann auch eine erhöhte Stabilität (Dolashki et al. 2019; Marshall et al. 2016; Burnett, Louis E., Scholnick, David A., Mangum, Charlotte P. 1988) eine Rolle in diesen schwierigen Habitaten spielen, welche von hohen Temperaturen, niedrigem pH-Wert und hohem Druck gekennzeichnet sind (Hashimoto et al. 2001; van Dover et al. 2002; Rogers et al. 2012; Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna 2006). Die Variabilität der Expression zweier verschiedener Hämocyanin-Typen kann diese nötigen Anpassungen an schwierige Habitate ermöglichen, wie bei *M. tuberculata* (Lieb et al. 2010), *R. venosa*, und *N. lapillus* (Schäfer et al. 2021a) bereits gezeigt.

Mollusken-Hämocyanine: Gene, Isoformen, Exon-Intron-Struktur

Für die Gesamtheit der Mollusken gilt die Aussage, dass bisher nur wenige Genome bekannt sind. Setzt man die Anzahl der sequenzierten Genome (407) in Bezug zu der geschätzten Zahl der rezenten Mollusken von 86.600 (W.O.R.M.S) wird deutlich, dass nur ein minimaler Teil der Spezies auf Genom-Ebene untersucht wurde.

Die weiteren assemblierten Hämocyanin-(Teil-)Sequenzen stimmten, soweit die Länge der Teilsequenz eine Beurteilung zuließ, mit dem „Keyhole limpet Typ“ überein. Für die einzige vollständig assemblierte Sequenz eines Caenogastropoden, *S. reiniana* konnte keine Exon-Intron-Struktur auf Grund fehlender Genomdaten ermittelt werden. In Hinblick auf die Tatsache, dass Caenogastropoden und Heterobranchia eine große Anzahl interner Introns (teilweise mehr als 50) in den Hämocyanin-Genen aufweisen (Schäfer et al. 2021c; Lieb et al. 2001; Chiumiento et al. 2020), wäre hier die Information zur Exon-Intron-Struktur einer weiteren Familie der Caenogastropoden informativ. *S. reiniana* gehört zur Superfamilie Cerithioidea, wie auch *M. tuberculata*, die das Mega-Hämocyanin (Lieb et al. 2010) aufweist. Zumindest konnte festgestellt werden, dass beide Hämocyanin-Isoformen von *S. reiniana* ähnlich lang sind und keine Sequenzlänge dem Mega-Hämocyanin entspricht. Dies kann darauf hinweisen, dass die Familie *Semisulcospiridae* den „Keyhole limpet Typ“ als Hämocyanin aufweist und das Mega-Hämocyanin auf die Familie Thiaridae beschränkt sein könnte. Die beiden Familien sind keine Schwester-Taxa, wobei die genaue Phylogenie der Cerithioidea mit zur Zeit 19 Familien (Stand 20.04.2024 (W.O.R.M.S)) noch nicht bekannt ist. Es wurde abhängig der Auswahl verschiedener Familien der Caenogastropoden keine monophyletische Familienverwandtschaft aufgelöst (Neiber und Glaubrecht 2019; Xu et al. 2024; Strong et al. 2011).

Die Assemblierung einer Teilsequenz eines Hämocyanins von der Autobranchia *C. plicata* (Unionidae) wäre der erste Nachweis für Hämocyanin in Autobranchia, wogegen Hämoglobin bei einigen anderen Autobranchia festgestellt wurde ((*Barbatia sp.* (Grinich und Terwilliger 1980), *Anadara inaequalvis* Arcidae (Gambacurta et al. 1993), (PONDER et al. 2020)). Bei der Hämocyanin-Teilsequenz von *C. plicata* gehe ich davon aus, dass es sich um eine Verunreinigung der Probe handelte und die Sequenz von anderen Organismen stammt, die z.B. als Nahrung dienten (Bourlat et al. 2003; Meyer et al. 2010). Denn bei den drei weiteren untersuchten Unionidae-Arten wurde, wie erwartet für Autobranchia, keine Hämocyanin-Sequenz assembliert. Die zweite Unterklasse der Bivalvia, die Protobranchia, weisen oftmals Hämocyanin als respiratorisches Protein auf und, im Falle von Endosymbionten, in den Kiemen auch Hämoglobin (Doeller et al. 1988). Bei *Nucula nucleus* wurden bereits zwei Hämocyanin-Isoformen nachgewiesen (Bergmann et al. 2007). Die hier untersuchten Proben von *A. bartschii*, *E. tenuis* und

N. pernula ergaben nur für *E. tenuis* eine Teilsequenz, wobei lediglich für *A. bartschii* angegeben war, welchen Ursprung die Probe hatte (Mantel), bei allen anderen fehlte diese Angabe. Aus Mantelgewebe wurden zwar mRNA-Hämocyanin-Sequenzen sequenziert (*Haliotis rubra* KU496942.1, KU496943.1), jedoch nur bei zwei von den zehn hier untersuchten Sequenz-Daten aus Mantelgewebe, bei *R. olivacea* (3267 bp) und *H. laevigata* (2214 bp), gelang die Assemblierung von Teilsequenzen. Gründe für die fehlgeschlagenen Assemblierungen von Hämocyaninen könnten in der Datenqualität oder in der fehlenden bzw. zu geringer Expression des Hämocyanins im Mantelgewebe liegen.

Sequenz-Daten der Caudofoveata von sechs Arten wurden hier in der Analyse untersucht. Bei zwei Arten der Gattung *Falcidens* konnten Teil-Hämocyaninsequenzen assembliert werden (*F. caudatus* 1.560 bp, für *F. sagittiferus* 4.422 bp), was mit den bereits veröffentlichten Hämocyanin-Sequenzen für *Falcidens crossotu* (AM949571, AM949572) konform ist (Lieb und Todt 2008). Eine weitere Spezies der Chaetodermatidae *C. nitidulum* wies ebenso eine Teil-Hämocyaninsequenz auf (1.998 bp). Für die drei weiteren Spezies aus den Familien Prochaetodermatidae (*P. californicum*, *S. clenchi*) und Limifossoridae (*S. ventrolienatus*) konnten keine Hinweise auf Hämocyanine gefunden werden. Dies könnte bedeuten, dass nur Chaetodermatidae als eine der drei Familien der Caudofoveata Hämocyanin exprimiert, die beiden weiteren Familien über kein Hämocyanin verfügen. Die Anzahl der verfügbaren Daten für Caudofoveaten ist nicht sehr groß, so konnten keine weiteren Auswertungen vorgenommen werden. Die Untersuchung weiterer Arten der Familien Prochaetodermatidae und Limifossoridae könnte den Befund bestätigen. Auch die Frage nach weiteren respiratorischen Proteinen steht noch im Raum.

Die Klasse der Cephalopoda, die sowohl mehrere Hämocyanin-Typen wie auch unterschiedliche Isoformen aufweist, wurde hier mit einigen Sequenzen in die phylogenetischen Analysen eingeschlossen. Die Assemblierung weiterer Sequenz war aber nicht Ziel meiner Arbeit. Lediglich die neuen Sequenz-Daten des *N. pompilius* wurden auf eine zweite Isoform untersucht. Diese wiesen jedoch nur die bereits bekannte Hämocyanin-Isoform auf, es gelang nicht aus den vorliegenden Daten eine weitere Isoform zu assemblieren. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Bergmann et al. (2006).

Bei den Gastropoden hingegen sind die Hämocyanin-Gene diverser. Eine bekannte Vertreterin der Vetigastropoden *Megathura crenulata* ist namensgebend für den bereits besprochenen „Keyhole limpet“ Hämocyanin-Typ (Lieb et al. 2000; Lieb und Markl 2004; Altenhein et al. 2002; Gatsogiannis und Markl 2013). In der phylogenetischen Analyse der Hämocyanin-Sequenzen waren zwei

Vetigastropoden (*Megathura crenulata* und *Haliotis rubra*) mit jeweils zwei Hämocyanin-Sequenzen vertreten, wogegen ich für die von mir untersuchten Vetigastropoden jeweils nur eine Isoform assemblieren konnte. Dies gilt auch für *H. laevigata*, wo auch nur eine Isoform assembliert werden konnte. Da bekannt ist, dass Haliotidae mehrere Hämocyanin-Isoformen aufweisen wurde dieses Ergebnis genauer untersucht. Durch das Alignment des Genoms von *H. laevigata* gegen HrH 1 und HrH 2 wurden zwei Loci der Hämocyanin-Gene, mit der für Vetigastropoden bekannten Exon-Intron-Struktur lokalisiert (siehe Ergebnisse). Eine mögliche Erklärung für die Assemblierung nur einer Hämocyanin-Isoform aus den Transkriptom-Daten ist, dass in den sequenzierten Transkriptom-Daten die zweite Isoform nur gering exprimiert wurde (Albrecht et al. 2001; Lieb et al. 2010; Sairi et al. 2015; Strobel et al. 2012), so dass die Assemblierung einer zweiten Isoform nicht gelang. Diese mögliche Erklärung wird durch Markl et al. (1991) gestützt, da hier festgestellt wurde, dass die zwei Hämocyanin-Isoformen nicht in gleichem Maß exprimiert werden und eine unterschiedliche Funktion der Grund sein könnte. Zudem ist für *M. crenulata* bekannt, dass Hämocyanin nach einer Blutabnahme nicht neu synthetisiert wird (Albrecht et al. 2001) und nicht zu jedem Zeitpunkt exprimiert wird (Keller et al. 1999; Lieb et al. 1999). Dies trifft nicht auf alle Vetigastropoden zu, da für *H. tuberculata* nicht die gleichen Expressionsmuster nachgewiesen wurden (Albrecht et al. 2001). Diese Befunde der unterschiedlichen Transkription können zur Erklärung herangezogen werden, warum aus einigen Transkriptom-Sequenzdaten der hier untersuchten Vetigastropoden keine Hämocyanin-Sequenzen oder nur eine Hämocyanin-Isoform assembliert werden konnte. Aus 13 Sequenz-Daten der insgesamt 41 untersuchten Spezies der Vetigastropoden konnte ich keine Hämocyanin-Sequenzen assemblieren aufgrund zu weniger reads, die „mappten“ (siehe Tabelle 7). Prinzipiell können Gründe für eine fehlgeschlagene Assemblierung einer Transkription-Sequenz sein, dass eine unzureichende Konservierung des Probengewebes durchgeführt wurde, eine zu geringe Datenqualität erzeugt wurde und keine oder zu geringe Expression des Transkripts zum Zeitpunkt der Konservierung vorlag (Adema et al. 2017; Jiang et al. 2015; Nagalakshmi et al. 2010).

Tabelle 7: Übersicht der Vetigastropoden-Spezies ohne Assemblierung einer Hämocyanin-Sequenz aus den Rohdaten unter Angabe der Accessionnummer, des akzeptierten Namens in WORMS und des Probengewebes.

Akzeptierter Name	Spezies	Accession-Nr.	Probengewebe	Body size/features
	<i>Amblychilepas nigrita</i>	SRR15563600	N/A	18 mm
Neocollonia pilula	<i>Bothropoma pilula</i>	SRR15563563	Ganzes Tier	5 mm
	<i>Cantrainea macleani</i>	SRR15563561	N/A	15 mm
	<i>Emarginula sp.</i>	SRR15563596	N/A	X
	<i>Lepetodrilus pustulosus</i>	SRR8318356	N/A	6 mm
	<i>Lucapina suffusa</i>	SRR15563586	N/A	25 mm
Arene tricarinata	<i>Marevalvata tricarinata</i>	SRR15563577	N/A	4 mm
	<i>Margarella refulgens</i>	SRR15563584	N/A	6 mm
	<i>Montfortula rugosa</i>	SRR15563582	N/A	24 mm
	<i>Perotrochus lucaya</i>	SRR15563579	N/A	X
	<i>Stomatia phymotis</i>	SRR15563571	Fuß	30 mm
	<i>Stomatolina sanguinea</i>	SRR15563570	Fuß	18 mm
	<i>Trochus maculatus</i>	SRR15563568	Fuß	70 mm

Die Gründe für die fehlgeschlagenen Assemblierungen können hier nicht determiniert werden. Von den insgesamt 16 Sequenzdaten aus Probengewebe des Fußes der Vetigastropoden wurden nur eine vollständige Sequenz assembliert, 12 Teilsequenzen mit sehr unterschiedlicher Länge, (siehe Tabelle 9) und in drei Fällen konnte kein Hämocyanin (Trochida) assembliert werden (siehe Tabelle 7). Die Möglichkeit, dass diese Arten kein Hämocyanin aufweisen, kann nicht ausgeschlossen werden. Wie bereits erwähnt, vermuteten Albrecht et al. (2001), dass nicht in allen Spezies zu jeder Zeit Hämocyanin exprimiert wird, sondern nur zu bestimmten Zeiten im Jahr.

Die bisher erste Hämocyanin-Sequenz einer Monoplacophora konnte hier assembliert werden. Die Struktur entsprach dem „Keyhole limpet Typ“ und somit wurde dieser Typ in einer weiteren Mollusken-Klasse bestätigt. Für die hier untersuchten Transkriptom-Daten lagen keine entsprechenden Genom-Daten vor, was eine Untersuchung der Exon-Intron-Struktur nicht ermöglichte. Für eine weitere Monoplacophora-Spezies *L. antactica* liegen zwar Genom-Daten vor, aber keine entsprechenden Transkriptome-Daten. Auf eine weitere Analyse dieser Daten musste aufgrund des Umfangs dieser Arbeit verzichtet werden.

Die Analyse der Hämocyanine der Polyplacophoren schloss sich an, für die bis zum aktuellen Zeitpunkt (08.04.2023) keine vollständigen Hämocyanin-Sequenzen publiziert wurden. Frühere molekulare Untersuchungen haben gezeigt, dass Polyplacophoren Homodimere besitzen (Harris et al. 2004; Warnke et al. 2011; Lieb und Todt 2008; Herskovits und Hamilton 1987; Herskovits et al. 1986). In meiner Arbeit wurden neue (Teil)-Sequenzen für die beiden Ordnungen Chitonida und Lepidopleurida assembliert, darunter sechs vollständige Hämocyanin-Sequenzen von insgesamt 17

untersuchten Arten. Alle identifizierten Sequenzen entsprachen dem „Keyhole limpet Typ“ hinsichtlich Länge und Sequenzstruktur. Obwohl die Anwesenheit von Hämocyanin-Transkripten in den Fußgewebsproben erwartet wurde, konnten nur für *A. granulata*, *A. loochooana* und *S. bahamensis* (Teil-)Sequenzen assembliert werden. Bei drei weiteren untersuchten Arten (*C. lata*, *C. japonica*, *C. septemvalvis*) war keine Assemblierung möglich, wobei alle Daten der drei Transkriptome aus einem Projekt stammen (PRJNA674863).

Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Arten entweder kein Hämocyanin besitzen, wobei auch keine Hinweise auf ein anderes respiratorisches Protein gefunden wurden, oder dass die Transkriptome nicht vollständig sequenziert wurden. Eine weitere mögliche Erklärung wäre analog zu den Vetigastropoden, dass zum Zeitpunkt der Probennahme kein Hämocyanin exprimiert wurde. Allerdings fehlen bisherige Hinweise auf Expressionsmuster der Hämocyanine dieser Klasse, was eine interessante Fragestellung für zukünftige Forschungsarbeiten darstellt. Weitere Transkriptomdaten oder Genomdaten lagen für diese drei genannten Arten nicht vor.

In meiner Arbeit wurde keine Evidenz für das Vorhandensein von Hämocyaninen bei den beiden untersuchten Callochiton-Arten gefunden. Jedoch wurde für *Callochiton bouveti* eine Teilsequenz veröffentlicht (AM949575.1). Für die Chitonida-Art *A. fascicularis* konnte kein Hämocyanin assembliert werden, möglicherweise aufgrund des niedrigen Expressionslevels im Larvengewebe, jedoch wurde in NCBI eine Hämocyanin-Teilsequenz publiziert (FM173223.1), was das Vorhandensein von Hämocyanin bestätigt. Ebenso wurde auch für *N. mirandus* (FM173217.1) eine 1.220 bp lange Sequenz publiziert.

Die Assemblierung von Hämocyaninen aus Probengewebe des Mantels war, wie bereits zuvor bemerkt, oft schwierig. Dies zeigte sich auch bei den Assemblierungsversuchen für *T. linaeta*, *H. hanleyi*, und *C. olivaceus*, wo entweder keine oder nur Teil-Sequenzen assembliert werden konnten. Es ist zu beachten, dass neben dem Gewebetyp auch die Methodik der Sequenzierung sowie alle Schritte von der Probennahme bis zur bioinformatischen Auswertung eine signifikante Rolle für die Qualität der Daten spielen (Gant et al. 2017). Obwohl hier festgestellt werden kann, dass Mantelgewebe sich oft weniger gut eignet als Fußgewebe, konnten weitere Einflussfaktoren in dieser Studie nicht bewertet werden. Von den 11 in der NCBI-Datenbank verfügbaren Genomen für Polyplacophoren liegt keines für Callochitonidae vor. Daher war eine weitere Untersuchung aufgrund des Mangels an verfügbaren Daten nicht möglich. Bei den Proben aus dem Fußgewebe konnten bei 23 von insgesamt 31 Proben (Teil-)Sequenzen assembliert werden, was einer Erfolgsquote von 74 % entspricht. Bei *L. asellus* zeigte sich, dass Proben aus dem Fußgewebe grundsätzlich für eine vollständige Assemblierung geeignet sind. Im Gegensatz dazu war dies bei

Proben aus dem Mantelgewebe nur bei 10 % der Rohdaten möglich. Dies spricht dafür bei weiteren Studien zu Hämocyaninen Proben aus dem Gewebe des Fußes zu bevorzugen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Scaphopoda und Solenogastres bestätigte die bisherige Annahme, dass diese beiden Mollusken-Klassen über kein Hämocyanin verfügen (Lieb und Todt 2008; PONDER et al. 2020).

4.2. Ferritin-Sequenzen in Mollusken

Es ist bekannt, dass einige Spezies mehr als eine Ferritin-Isoform exprimieren. Für jede hier untersuchte Spezies konnte jedoch lediglich eine Ferritin-Sequenz assembliert werden, was die Determination der orthologen Isoformen durch das Alignment und die anschließende phylogenetische Untersuchung nicht ermöglicht. Ein wichtiger Aspekt, der bei der Analyse der Ferritin-Sequenzen zu berücksichtigen ist, besteht darin, dass die untersuchten Ferritin-Sequenzen ausschließlich den Open Reading Frame (ORF) umfassten ohne die nicht-translatierte Region (UTR) mit dem Iron-Responsive Element (IRE). Das IRE beeinflusst die Sekretion von Ferritinen und ist ein Element, das nicht in allen Ferritinen vorkommt, wie zum Beispiel bei Dotterferritin von *L. stagnalis* und in *Schistosoma mansoni*. Da dieser Sequenz-Bereich nicht assembliert wurde und somit nicht in die Analyse eingeflossen ist, wird an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen, für einen Überblick siehe (Andrews 2010; Andrews et al. 1992; Plays et al. 2021; Harrison und Arosio 1996). Ein weiterer Aspekt ist, dass sich Ferritine bei der Assemblierung zu Homo- und Heterodimeren zusammenfügen (He et al. 2016), welche unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf die Eisenspeicherung und die Immunabwehr haben können. Auch diesen Aspekten der Aufgaben und Funktionen kann hier aufgrund der Datenlage und des zeitlichen Umfangs dieser Arbeit keine Rechnung getragen werden. Diese Einschränkungen schienen der grundsätzlichen Überlegung die Ferritin-Sequenzen als weitere Informationsquelle für phylogenetische Analysen heranzuziehen nicht entgegenzustehen. Ferritine wurden von mir gewählt, da diese gegenüber Hämocyaninen den Vorteil haben, dass Ferritin ubiquitär in allen Lebewesen vorkommt (Theil 1987; Andrews et al. 1992). Dennoch müssen auch hier die gleichen Schwierigkeiten für die transkriptomische Analyse analog zu den Ausführungen im Textabschnitt der Hämocyanine in der Gewinnung sowie Prozessierung der Proben, der Sequenzierung und aller „downstream“-Schritte der Analyse, überwunden werden. Dementsprechend konnten aus 90 Daten 81 Ferritin-Sequenzen assembliert werden. Die genauen Ursachen für die fehlgeschlagenen Assemblierungen von Ferritin-Sequenzen bleiben unklar, werden aber in den vorgenannten Schwierigkeiten begründet sein. Es ist außerdem zu beachten, dass Transkriptomdaten ein temporäres Geschehen im Organismus

(Expressionsmuster) widerspiegeln (Salinas-Clarot et al. 2011; Chávez-Mardones et al. 2013), was eine mögliche Erklärung dafür sein könnte.

Hinsichtlich der Analyse-Ergebnisse der Ferritine der Bivalvia wurde für die Protobranchia die erste Ferritin-Sequenz für *E. tenuis* assembliert, sodass kein Vergleich der Sequenzstrukturen der Ferritine innerhalb dieser Unterklasse gezogen werden konnte. Die Ferritin-Sequenz zeigte mit allen anderen hier untersuchten Ferritin-Sequenzen eine Identität zwischen 45 % (*L. japonica*) und 88 % (*G. tolmei*). Aus den Rohdaten von *A. bartschii* gelang die Assemblierung einer 213 bp langen Teilsequenz, die hier nicht in die Analyse eingeflossen ist und für *N. nucleus* lagen keine Rohdaten für eine Assemblierung vor, weshalb nur deren Hämocyanin-Sequenzen untersucht wurden. Es lässt sich aus diesen Ergebnissen und den vorliegenden Daten keine Aussage über die Anzahl der Ferritin-Gene, Expression und deren Sequenzlängen in Protobranchia treffen. Die Untersuchung der Ferritine erfolgte zuvor bei Martínez et al. (2023) indirekt in Zusammenhang mit Genexpressionsmustern unter thermischem Stress und zeigte, dass die Ferritin-Expression in Zusammenhang mit der Stressantwort auf veränderte Temperaturen im Habitat, im Hinblick auf den Klimawandel, steht. Es liegen somit für diese Unterklasse keine weiteren Kenntnisse über die Ferritin-Gene und Transkriptome vor und weitere Forschung ist notwendig.

Für das artenreichere Schwestertaxon Autobranchia konnten 13 der insgesamt 18 untersuchten Ferritin-Sequenzen assembliert werden. Für die Unionidae *Megaloniaias nervosa* wurden in NCBI bereits fünf unterschiedliche Ferritin-Proteinsequenzen publiziert, wobei sich zu einer dieser Ferritin-Sequenz (MDW5039771) eine maximale Übereinstimmung mit 94 % zu der von mir assemblierten Sequenz zeigte. Alle bereits in NCBI publizierten Soma-Ferritine dieser Spezies wurden aus Gonadengewebe sequenziert. Die Rohdaten, die meiner Assemblierung zugrunde lagen, stammten aus der Sequenzierung des Fußgewebes. Die Sequenzen der drei Soma-Ferritine variieren in der Länge zwischen 143 AS und 174 AS und die zwei Dotter-Ferritine zwischen 229 AS und 268 AS, ähnlich dem Dotterferritin der Heterobranchia *L. stagnalis* (X56779.1) mit 240 AS Länge. Weitere Transkriptom-Daten aus Dottergewebe lagen für Autobranchia nicht vor, weshalb kein Rückschluss auf eine grundsätzlich längere Ferritin-Sequenz im Dotter im Vergleich zu Soma-Ferritinen an dieser Stelle gezogen wird. Jedoch begrenzen sich diese deutlich längeren Ferritin-Sequenzen nicht auf Dotterferritine in anderen Mollusken-Klassen, da Ferritin-cDNA-Sequenzen für *C. aspersum*, *H. laevigata*, *L. pustulosus*, *L. japonica*, und *S. inermis* ebenfalls mit Sequenzlängen zwischen 609 bp und 690 bp assembliert bzw. publiziert wurden (vergleiche Tabelle 13). Für einige Spezies der Autobranchien, wie auch Gastropoden, ist bekannt, dass es bis zu fünf Ferritin-Isoformen exprimiert werden (*M. nervosa*, *Argopecten* (He et al. 2011; La Coba de Peña et al. 2016), *Chlamys* AY653293.1, AY653294.1, AY653295.1, *Patinopecten yessoensis* (Zhang et al.

2013)). Insgesamt wurden 132 Ferritin-Proteinsequenzen bereits veröffentlicht, und in PDB sind vier 3D-Strukturen für diese Subklasse hinterlegt. Jedoch sind die Expressionsmuster, die Sequenzstruktur und die Eigenschaften dieser Ferritine meist nicht bekannt. Die Analyse zusätzlicher Daten der Bivalvia wurde zugunsten der Untersuchung der Ferritin-Sequenzen weiterer Mollusken-Klassen eingeschränkt, gefolgt von der Analyse der Ferritin-Sequenzen der Caudofoveaten.

Die Datenverfügbarkeit von Transkriptomen für die Klasse der Caudofoveata ermöglichte die Assemblierung von insgesamt sechs Ferritin-Sequenzen, wobei nach heutigem Stand keine Ferritin-Sequenzen für Caudofoveaten publiziert wurden. Die Ferritin-Sequenz von *F. sagittiferus* hat zur Ferritin-Sequenz von der zweiten Spezies desselben Genus *F. caudatus* eine Identität von 71%, ähnlich ist die Sequenz-Identität mit 70 % der Prochaetodermatidae *S. clenchi* und *P. californicum*. Dies zeigt ebenso, dass die Zugehörigkeit zum selben Genus keine höhere Ferritin-Sequenzidentität bei Caudofoveaten aufweist als zu weiter entfernten Arten. Generell lagen die weiteren Werte für die Sequenz-Identität der Caudofoveata zwischen 66-68 %, vergleichbar mit den Identitätswerten der Bivalvia. Die Ferritin-Sequenzlängen waren zwischen 513 bp und 534 bp, Daten für die Assemblierung von Dotterferritinen sind zurzeit nicht verfügbar. Die Frage nach einer möglichen Abweichung der Ferritin-Sequenzlänge im Dotter, wie bei Bivalvia beobachtet, kann also bis weitere Daten vorliegen nicht beantwortet werden.

Auch für die Cephalopoden konnten hier vier Ferritin-Sequenzen in die Analyse einfließen. Die assemblierte Ferritin-Sequenz von *S. inermis* aus Gewebe des Tintensacks wich mit 609 bp deutlich von der mittleren Sequenzlänge der Ferritine aller Mollusken mit 529 bp ab, was auch auf die Ferritin-Sequenzen von *L. japonica* (672 bp), *L. pustulosus* (642 bp), *H. laevigata* (633 bp), *C. aspersum* (690 bp) zutrifft. Für die vorgenannten Ferritin-Sequenzen liegt keine höhere Sequenz-Identität im Vergleich zu den weiteren Ferritin-Sequenzen aller Mollusken vor. Unter der Accession JX401574.1 wurde bereits eine Ferritin-mRNA-Sequenz für *S. inermis* mit einem ORF von 516 bp publiziert. Aus den dortigen Angaben ließen sich keine Informationen zum Probenmaterial entnehmen. Zum Einen zeigte sich bei Studien zur Regulation der Expression von juvenilen und adulten Tintenfischen, dass unter anderem die Ferritin-Expression in symbiontisch lebenden Tintenfischen im Vergleich zu juvenilen nicht-symbiontischen Individuen hochreguliert ist (Kremer et al. 2013). Und zum Anderen spielen Ferritine ebenso in der Immunantwort eine Rolle (Kremer et al. 2013) was sich im Fall von Tintenfischen in der Wirt-Symbiont-Beziehung mit *Vibrio fischeri* durch eine veränderte Expression von Genen zeigt (Septer et al. 2011). Letztlich gibt der Befund der zwei Ferritin-Isoformen für *S. inermis* und drei Ferritin-Isoformen für *Octopus vulgaris* (ein „venom-related“ Ferritin ((222 AS, CAI9733223) und zwei Soma-Ferritine (211 AS, CAI9733130.1

und 174 AS, CAI9733130.1)) einen Hinweis darauf, dass auch in dieser Mollusken-Klasse mehr als ein Ferritin-Gen existiert und exprimiert wird, weitere Erkenntnisse konnten aber aus meiner Studie aufgrund fehlender weiterer Daten nicht erfolgen.

Zu diesen Befunden steht die Datenverfügbarkeit der Gastropoden im Gegensatz, da hier große Datenmengen vorliegen und ein großes Forschungsinteresse widerspiegeln. Beispielhaft ist die große Zahl der Studien, die sich mit *B. glabrata* (Rohdaten-Sätze 2.400 im SRA, 4138 Einträge im PubMed Central, Stand 02.06.2024) aufgrund der Relevanz für die Bilharziose (WHO) befassten. Die Datenverfügbarkeit für Gastropoden ermöglichte es, dass insgesamt 50 Ferritin-Sequenzen in die Alignments und phylogenetischen Untersuchungen eingeschlossen werden konnten, davon 41 de novo assemblierte Ferritin-Sequenzen. Der wissenschaftliche Fokus lag bisher auf für den Menschen relevanten Gastropoden, entweder im Sinne einer Gesundheitsbedrohung oder als Quelle für medizinische Anwendungen. Ein Beispiel für die medizinische Verwendung ist der Einsatz von Conotoxin in der Schmerzbehandlung (Safavi-Hemami et al. 2019; Layer und McIntosh 2006). Ferritine wurden unter anderem im Zusammenhang mit der Giftproduktion in den Giftdrüsen der Conus-Spezies untersucht (Pardos-Blas et al. 2022). Schon seit vielen Jahrzehnten ist bekannt, dass Ferritin das Hauptprotein in Oozyten der Gastropoden ist (Fioroni, P, Schmekel, L 1976). Für den Genus Conus, der über 800 Arten zählt, wurden 30 Ferritin-Sequenzen mit bis zu drei Isoformen bereits veröffentlicht. In den von mir durchgeführten Alignments mit Ferritin-Sequenzen von drei Conus-Arten stellte ich fest, dass die Ferritin-Sequenz von *C. ermineus* (MH360399.1) im Gegensatz zu den beiden anderen Conus-Arten zueinander lediglich eine Sequenz-Identität von 70 % zu *C. ebraeus* (KY963315.1, FTH1) und *C. frigidus* (KY765615.1, FTH1), wie auch zu den anderen Caenogastropoden aufwies. Dies könnte auf der entfernteren Verwandtschaft beruhen (Duda und Kohn 2005; Puillandre et al. 2014), da diese Art von den drei untersuchten Arten die einzige im Atlantik lebende ist (Rudolf Kilius 1997), oder als Anpassung an das Habitat erfolgt sein. Alle drei Arten leben in tropischen Gebieten, *C. ermineus* ist jedoch in bis zu 100 m Tiefe anzutreffen, die anderen beiden Arten leben in der obersten Zone bis 10 m (sealifebase.ca). Eine weitere Erklärung für die geringere Sequenz-Identität könnte auch darin liegen, dass nicht orthologe Isoformen aligniert wurden. Die bisherigen bis zu drei Ferritin-Isoformen im Genus Conus, wobei eine mit der Giftsynthese in Zusammenhang steht, geben einen Hinweis darauf, dass Ferritine unterschiedliche Funktionen im Laufe der Evolution und der Anpassungen der Arten erlebten. Diese Fragen ließen sich durch die Assemblierung und Alignierung weiterer Isoformen der Ferritine gegebenenfalls beantworten, was aufgrund der Datenlage nicht durchgeführt werden konnte.

Eine weitere untersuchte Art ist die Heterobranchia *L. stagnalis* (Rivi et al. 2020; Kuroda und Abe 2020; Seppälä et al. 2021; Amorim et al. 2019; Darl et al. 1994). Für diese Spezies wurden zwei unterschiedliche Isoformen gefunden, die in die Soma- und die Oozyten-Form differenziert exprimiert werden (Bottke 1982). Beide unterscheiden sich in Größe und Eigenschaften, da sie unterschiedliche Funktionen im Laufe der Ontogenese erfüllen (Darl et al. 1994; Bottke 1982). In Transkriptom-Studien wurden drei nicht weiter sequenzierte Ferritin-Varianten für diese Spezies erwähnt (Seppälä et al. 2021). Aus den verfügbaren Rohdaten gelang keine Assemblierung dieser dritten Isoform. Auch für die drei weiteren in meine Untersuchungen eingeschlossenen Arten der Heterobranchia konnten keine zusätzlichen Ferritine (außer *C. asperum*, neu Assemblierung) assembliert werden und kein Nachweis für weitere Isoformen erbracht werden. Ähnliche Ergebnisse lag auch für die beiden Peltospiridae in Bezug auf die Assemblierung der Ferritine vor. Diese beiden Spezies weisen, wie bereits in der Einleitung erläutert, eine anatomische Besonderheit bezüglich der Beherbergung ihrer Endosymbionten auf (Lan et al. 2021; Lan et al. 2022). Eine endosymbiontische Lebensweise bewirkt oder setzt voraus, dass die Expression verschiedener Gene der Wirte, wie Ferritin als Bestandteil der Immunantwort (Andrews et al. 1992) durch die Endosymbionten beeinflusst werden (Boutet et al. 2011; Kremer et al. 2013). Eine Untersuchung der verfügbaren Genom-Daten auf das Vorhandensein mehrerer Ferritin-Gene erfolgte aus zeitlichen Gründen nicht. Aber durch die Tatsache, dass bei einem Schlangenfisch aus der Abyssopelagial-Zone 14 Genkopien der Ferritin-H-Kette nachgewiesen wurden, um die Auswirkungen der reaktiven Sauerstoffspezies zu minimieren (Xu et al. 2023) ist die Frage nach der Anzahl der Genkopien in zukünftigen Untersuchungen wichtig. Zurzeit wurde für keine Molluske eine so große Zahl von Ferritin-Genen nachgewiesen.

In meiner Arbeit bildeten die Vetigastropoden die größte zahlenmäßige untersuchte Unterklasse der Gastropoden mit fast 40 Ferritin-Sequenzen. Studien zum Ort der Synthese und zur Funktion der Ferritine in Vetigastropoden wurden schwerpunkthaft in Haliotis durchgeführt (Jackson et al. 2007; Zoysa und Lee 2007; Salinas-Clarot et al. 2011; La Coba de Peña et al. 2018), Sequenzdaten sind dennoch rar, es wurden 35 Sequenzen neu assembliert und hier analysiert. Es zeigte sich, dass keine signifikanten Unterschiede der Ferritine weder innerhalb der Ordnungen oder Familien in der Sequenzlänge oder Sequenzstruktur auszumachen waren. Zumindest für den Genus Haliotis (*H. discus hannai*) sind bis zu drei verschiedene Ferritin-Sequenzen publiziert worden (DQ845482.1/GU479917/EU660052), wovon zwei dieser Isoformen aus Daten des Hepatopankreas-Transkriptom sequenziert wurden (Ort der Detoxifikation). Für *H. rufescens* (GU191936.1/MH006611/MH006612) wurden drei Ferritin-Isoformen publiziert.

Für keine weiteren Vetigastropoden konnten mehr als eine Ferritin-Sequenz assembliert werden, was leider keine Aussage über die Entwicklung der Ferritin-Isoformen bei den Vetigastropoden

zuließ. Sequenzdaten sollten vorzugsweise aus hepatopankreatischem Gewebe gewählt werden, wenn verfügbar. Sollten die weiteren Isoformen weniger stark exprimiert werden, sind sie eventuelle in Daten des ganzen Organismus nicht auszumachen. Auch die Tatsache, dass nicht alle Ferritin-Isoformen zum Zeitpunkt der Probenahme exprimiert werden, könnte den Nachweis in Transkriptom-Daten unmöglich machen. Somit sind auch Genom-Daten in weiterführenden Studien mit einzubeziehen.

Die Klasse der Monoplacophora ist hier mit einem Datensatz vertreten und es konnte die erste Ferritin-Sequenz für diese Klasse assembliert werden. Die hier untersuchte Art *L. hyalina* lebt in Tiefen zwischen 350 bis 400 m und wird bis 2 mm ca. groß (Wilson et al. 2009). Die Ferritin-Sequenz hatte die größte Sequenz-Identität mit den Sequenzen von *Arca noae* und *Tegillara granosa*, beide Autobranchia, mit 87 %, wobei keine signifikante Identität auszumachen war, die übrigen Werte wichen nicht wesentlich ab (69 – 84 %). Diese Ergebnisse spiegeln sich in den Phylogrammen wider und werden später diskutiert.

In der Klasse der Polyplacophoren lagen insgesamt 13 Ferritin-Sequenzen für das Alignment vor, wobei die Ordnungen Chitonida (10 Sequenzen), Lepidopleurida (zwei Sequenzen) und Callochitonida (eine Sequenz) unterschiedlich stark vertreten waren, wovon bis auf *L. japonica* alle Ferritin-Sequenzen neu assembliert wurden. Für Lepidopleurida ist bekannt, dass sich diese Klasse früh von den restlichen Polyplacophoren abgespalten hat (Irisarri et al. 2020; Moles et al. 2021). Diese frühe Divergenz könnte sich in den Identitäts-Werten widerspiegeln, beide Lepidopleurida weisen die höchste hier bestimmte Sequenzidentität innerhalb der Polyplacophoren mit 94 % auf. Die Identitäten zu allen anderen Polyplacophoren (außer *L. japonica*) liegen zwischen 63 und 81 %, innerhalb der Chitonida wurden Werte zwischen 69 und 90 % (bei den anderen beiden Spezies des Genus *Acanthopleura*) erreicht. Daten weiterer Vertreter der vier Familien innerhalb der Lepidopleurida lagen für weitergehende Untersuchungen nicht vor. Wie auch für die anderen Mollusken-Klassen wurde für Polyplacophoren nachgewiesen, dass sie über mindestens zwei Ferritin-Isoformen mit unterschiedlichen Eigenschaften verfügen können (Varney et al. 2021). Für die Isoform 1 der Ferritine von *A. granulata* wurde festgestellt, dass diese durch das IRE reguliert wird, was nicht auf die Isoform 2 zutrifft; welche weniger stark exprimiert wird (Moles et al. 2021). Die Funktion von Ferritin in der Biomineralisation der Radula-Zähne der Polyplacophoren wurde bereits seit vielen Jahren erforscht (Brooker et al. 2003; Kim et al. 1986) und in diesem Zusammenhang spielt Ferritin eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von Eisen für die Entwicklung dieser Radula-Zähne (Varney et al. 2021). Zum einen muss also Eisen gebunden werden, um die schädlichen Auswirkungen auf den Organismus zu verhindern und zum anderen muss Eisen für die Radulazähne bereitstellen. Dies wird durch die unterschiedliche Expression der

beiden Isoformen, deren unterschiedliche Regulation und Expression in differenten Körperregionen, gewährleistet.

Wie aber auch für alle anderen Mollusken-Klassen in dieser Studie konnte aus den vorliegenden Transkriptom-Daten jeweils nur eine Isoform assembliert werden.

Für die zehn Ferritin-Sequenzen der artenreichen Chitonida ohne *L. japonica* betrachtet lagen keine weiteren Sequenzdaten in NCBI vor, was also keine vergleichenden Analysen zuließ. Drei der vier Superfamilien der Unterordnung Acanthochitonina weisen Gemeinsamkeiten in den zwei fehlenden AS an Position 3-5 nach dem Start-Codon auf, was aber nicht für die letzte der vier Unterordnungen gilt. Mopaliioidea fehlen am 3´Ende drei Nukleotide, also ein Codon, wie es auch für Callochiton festgestellt wurde. Dieser gehört aber zu einer anderen Ordnung, Callochitonida. Insgesamt wiesen die Polyplacophoren nur zwei strukturelle Abweichungen auf, die Sequenz-Identitäten betrug mindestens 69 % ohne die beiden Sequenzen von *L. japonica* und *A. rubrolineata*, die länger waren. Da bisher keine weiteren Sequenzen assembliert wurden, und auch keine weiteren Isoformen untersucht werden konnten beschränkt sich die Aussagekraft darauf, dass zwei Sequenzen stark abwichen, die beide nicht aus Dottergewebe gewonnen wurden.

Bei den drei Ferritin-Sequenzen der Scaphopoda zeigten sich im Sequenzalignment keine auffälligen Gemeinsamkeiten innerhalb der Klasse, wie auch zu den anderen hier eingeschlossenen Mollusken-Ferritinen. Dies könnte in den unterschiedlichen Habitaten begründet sein (Verbreitung in verschiedenen Klimazonen und unterschiedlichen Tiefen) (Steiner und Kabat 2004). Es lässt sich feststellen, dass die Identitäten der Ferritin-Sequenzen in vergleichbaren Bereichen der Caudofoveaten liegen (68-75 %). *A. entalis* (Dentaliidae) und *G. tolmiei* (Gadilidae) wiesen die höhere Sequenz-Identität zueinander mit 75 % auf, wohin gegen *G. eborea* (Dentaliidae) eine geringere Sequenz-Identität zu *A. entalis* (73 %) hat. *A. entalis* und *G. tolmiei* gehören unterschiedlichen Ordnungen an und teilen sich kein Habitat, aber vielleicht ist die größere Ähnlichkeit in Zusammenhang mit dem großen Verbreitungsraum zu sehen, der sich von gemäßigttem Klima bis in die Polarregion zieht. Für *G. eborea* ist ein Verbreitungsraum in den Tropen bekannt (Steiner und Kabat 2004). Im Rahmen meiner Arbeit kann ich feststellen, dass sich die Ferritin-Sequenzen sich über die Ordnungen hinweg ähnlicher sind, was nicht in der phylogenetischen Entwicklung begründet ist. Da diese Klasse über keine Hämocyanine verfügt, ergaben sich keine weiteren Erkenntnisse zur phylogenetischen Position innerhalb des Mollusken-Stammbaums. Die UTR hätte generell für alle Ferritin-Sequenzen einen entscheidenden Informationsgehalt geliefert, um sie in sekretorisch und nicht-sekretorisch einzuteilen und funktionale Unterschiede der Ferritine bei der Betrachtung mit einzubeziehen.

Solenogastres sind mit *M. fodiens*, welche zur Familie Dondersiidae gehört und *Epimения babai* (Epimieniidae) in der Analyse vertreten. Für die Solenogastren wird nach der Klasse in Familien differenziert, nach Kocot et al. (2019) bilden beide keine Schwestertaxa. Auch bei Yap-Chiongco et al. (2024) wird die Phylogenie dieser beiden Familien als frühe Divergenz von Dondersiidae und eine jüngere Erscheinung der Epimieniidae publiziert. Beide Spezies sind unterschiedlich groß (> 4 mm *M. fodiens* (Salvini-Plawen 1986) und bis zu 30 cm *E. babai* (Salvini-Plawen 1997)). Insgesamt werden laut (W.O.R.M.S) zum aktuellen Stand (13.04.2024) 35 Familien gezählt. Ich kann feststellen, dass die Sequenzidentität mit 67 % vergleichbar gering mit den vorherigen Alignments war. Eine Einbeziehung von Daten weiterer Familien dieser speziellen Mollusken-Klasse könnte weitere Hinweise sowohl auf die phylogenetische Position der Familien, wie auch der Klasse, liefern. Da die hier untersuchten Arten kein Hämocyanin aufwiesen und die Aussagen aus den Ferritin-Sequenzen nicht valide waren, ist hier keine weitere Aussage möglich. Die beiden hier assemblierten Ferritin-Sequenzen sind die ersten dieser Mollusken-Klasse, und ob weitere Isoformen hier vorkommen, kann nicht beantwortet werden. Diese Fragen werden nur mit weiteren Transkriptom-Daten und Referenzgenomen zu beantworten sein. Eine Blast-Suche des Genoms von *E. babai* ergab Hinweise auf vielleicht drei Isoformen, dies muss noch weiter untersucht werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnte.

4.3. Phylogenetische Untersuchungen der Transkriptom Sequenzen

Schon lange gibt es Kontroversen bei der Zuordnung von Ordnungen, Familien und Spezies in der über 200-jährigen Geschichte der Malakologie (für einen Überblick siehe Sigwart und Lindberg (2015) und Ponder et al. (2020)).

In der hier erstellten Phylogenie der Ferritin-Sequenzen wurde deutlich, dass diese im Vergleich zu Hämocyaninen oder mehr faktoriellen Untersuchungen nicht ausreichten, um die komplexen Verwandtschaftsverhältnisse der Mollusken aufzulösen (Sigwart und Lindberg 2015; Sigwart et al. 2021). Insgesamt sind die Bootstrap-Werte in diesem Ferritin-Phylogramm nicht aussagekräftig und somit können keine Erkenntnisse bezüglich der Phylogenie der Ferritine der Mollusken daraus gewonnen werden. Ursache hierfür könnte die Tatsache sein, dass mehrere Ferritin-Isoformen in den verschiedenen Spezies, nachweislich in Bivalvia und Gastropoda, exprimiert werden (He et al. 2011; La Coba de Peña et al. 2016; Li et al. 2012; Zhang et al. 2013; Zoysa und Lee 2007). Bei den meisten untersuchten Arten ist lediglich eine Ferritin-Sequenz bekannt, wie sie auch aus den Transkriptom-Daten assembliert werden konnte. Für die Arten, bei denen mehrere Ferritin-

Sequenzen bekannt sind, wurde eine der Sequenzen für die Analyse ausgewählt, wobei es sich nicht um orthologe Ferritin-Sequenzen gehandelt hat. Für weitere Analysen müssen orthologe Ferritin-Sequenzen herangezogen werden. Durch Einbeziehung der 5'UTR könnte das IRE Motiv weitere Differenzierungsmöglichkeiten liefern, um die Orthologen zu identifizieren und so eine Phylogenie der Ferritin-Sequenzen zu erstellen.

Die Hämocyanin-Sequenzen wurden bereits für phylogenetische Analysen verwendet (Lieb und Markl 2004). Die hier publizierte Phylogenie der Cephalopoden-Hämocyanine stimmt mit den vorhergehenden Studien überein. Nautiloidea-Hämocyanine divergieren früh von den Coleoidea (Schäfer et al. 2019) und in der weiteren Evolution fand ein Duplikationsevent nach der Trennung von Octopoda und Sepiida (Schäfer et al. 2019) statt.

Eine bekannte Hypothese ist die Aculifera-Hypothese, die besagt, dass Polyplacophora die Schwesterklasse zu Chaetodermomorpha (Caudofoveata) und Neomeniomorpha (Solenogastren) sind (Kocot et al. 2011; Kocot et al. 2020). Vinther et al. (2012) bestätigten die Aculifera These und widerlegten die Aussage, dass Aplacophora eine basale Gruppe der Mollusken sind, es wird postuliert, dass Aculifera und Cephalopoden einen Clan bilden und verwandt zum Schwestertaxon Gastropoden + Bivalvia sind. Eine Abwandlung zeigen Dunn et al. (2008), hier sind die Cephalopoden Schwestertaxon zu Caudofoveata und beide Schwester zu Polyplacophora.

Wenn wir davon ausgehen, dass Aplacophora und Polyplacophora zusammen Aculifera bilden, sehen wir bei der Analyse von Kocot et al. (2019) und Zapata et al. (und der Prämisse, dass Gastropoda und Bivalvia ein Taxon bilden), dass Caudofoveata basal zu Solenogastres stehen und beide monophyletisch sind. Da sich ein Phylogramm durch Einschluss oder Entfall von Klassen, Ordnungen oder Spezies anders darstellt macht dies Vergleiche zwischen verschiedenen Analysen schwierig. Aufgrund der fehlenden Hämocyanine in einigen Klassen können diese Hypothesen hier nicht bewertet werden.

Auch für die Phylogenese innerhalb der Gastropoden wurden unterschiedliche Hypothesen vertreten. Bei Aktipis und Giribet (2010) und Kocot et al. (2020) werden Hypothesen postuliert, die sich teilweise mit meinen Ergebnissen decken, wie die Verbindung von Caenogastropoden mit Heterobranchia als Schwestergruppe (Kocot et al. 2020; Cunha und Giribet 2019a), wie es auch in Rondón et al. (2024) auf der Ebene der chemo-sensorischen Genfamilien bestätigt wurde. Auch bei Schäfer et al. (2021c) werden die Hämocyanin-Gene der Caenogastropoden und Heterobranchia als Schwester-Taxa gesehen. Eine Übereinstimmung der Schwesterposition von Vetigastropoden und Neomphaliones, wie hier festgestellt wurde, ist auch bereits postuliert worden (Sun et al. 2020a). In allen betrachteten Phylogenien ist die Monophylie der Gastropoden gut unterstützt. Für eine Übersicht empfehle ich Ponder 2019; Ponder 2008. Bei Zapata et al. (2014) wird ein Überblick

über verschiedene Hypothesen der internen Verwandtschaft der Gastropoden gegeben, hier sind Monoplacophora mit eingeschlossen, diese bilden die Schwester zu Cephalopoden und Aculifera sind basal hierzu und Scaphopoda näher mit Gastropoda + Bivalvia verwandt.

Die Position der Monoplacophora ist, wie viele andere im Stammbaum, auch noch nicht abschließend aufgeklärt. In meiner Studie divergieren die Monoplacophoren früh von den Polyplacophoren, jedoch mit einer schwachen Unterstützung, und beide bilden das Schwester-Taxon zu Cephalopoda. Bei Smith et al. (2011) wurden alle Mollusken-Klassen in die Analyse eingeschlossen und in keinem Modell bildeten die Monoplacophoren dort mit den Polyplacophoren ein Schwester-Taxon. Kocot et al. (2020) haben analog meiner Untersuchung einen neuen Datensatz von einer Monoplacophora (*Laevipilina antarctica*) für die Phylogenie aller Subklassen der Mollusken eingeschlossen. Bei den dort vier verschiedenen gewählten Methoden wurde in keinem Fall Monoplacophora als Schwester zu Polyplacophora positioniert. Bei der vorgehenden Untersuchung von Giribet et al. (2006) wurde jedoch genau diese Verwandtschaft publiziert. Auch hier wurde *Laevipilina antarctica* untersucht, aber mit einem 1,2 kb langen Fragment der 28SrRNA, eine im Vergleich zu heutigen Analysen kurze Sequenz. Insgesamt sind weder Bivalvia noch Gastropoda bei Giribet et al. (2006) monophyletisch.

Die postulierte Seralia-These, also Polyplacophora und Monoplacophora als Schwestertaxa, ist das Ergebnis meiner Analysen und wird auch von Wilson et al. (2010) unterstützt. Für Callochitonida ließ sich aus den verfügbaren Transkriptomdaten kein Hämocyanin assemblieren. Somit begrenzt sich meine Aussage auf die beiden artenreicheren Ordnungen Chitonida und Lepidoleurida. Bei Irisarri et al. (2020) gliedern sich die Chitonida in zwei Äste, und Callochiton divergiert um 292 mya (244-336) vor deren Aufspaltung. Die Abspaltung der Lepidopleurida erfolgt bereits 338 mya. Es gibt einige Diskussionen auch bei den Polyplacophoren, ob es drei oder zwei Ordnungen gibt. Für drei Ordnungen haben sich in jüngster Zeit einige Forschende ausgesprochen (Alnashiri et al. 2023; Moles et al. 2021), was auch in der Eingruppierung von (W.O.R.M.S) übernommen wurde.

Die hier zahlenmäßig stark vertretenen Vetigastropoden sind nicht die artenreichste Subklasse der Gastropoden, dennoch werden immerhin vier Ordnungen mit 40 Familien und 2.565 Arten zurzeit hier zugerechnet, wobei auch hier ursprünglich zugerechnete Ordnungen, wie Neomphalina, nun die eigenständige Subklasse Neomphaliones bilden (Kano 2008; Hess et al. 2008). Die Monophylie bei den Vetigastropoden ist nicht etabliert (Aktipis und Giribet 2010; Aktipis und Giribet 2012). Die Position und Zugehörigkeit von Familien, wie Skeneidae, zur Subklasse Vetigastropoda wurde schon lange diskutiert (Williams et al. 2008; Kano 2008; Williams 2012; Hickman 2013; Haszprunar et al. 2016). Aktipis und Giribet 2012; Cunha und Giribet 2019b schlossen *M. ammonoceras* (Skeneidae) in Ihren Studien ein. In meiner Analyse bildet diese Art im Phylogramm der

Hämocyanine das Schwester-Taxon zu *A. porcata* und beide bilden gemeinsam das Schwestertaxon zu Haliotidae. *H. octoradiata* ist die Schwester zu *Puncturella*, diese Positionen finden sich auch bei Cunha und Giribet (2019b). Von den 18 dort untersuchten Familien wurden hier 15 auf Hämocyanine untersucht und lediglich für zwei Familien vollständige Hämocyanin-Sequenzen assembliert, was die phylogenetische Analyse der Hämocyanine der Vetigastropoden stark einschränkte. Jedoch ist dies ein großer Wissensgewinn, da bis jetzt nur Haliotidae- und *M. crenulata*-Hämocyanine assembliert wurden. Von den 15 untersuchten Familien wiesen vier keine Hämocyanine auf und in 11 Familien konnte zumindest eine Teilsequenz assembliert werden. Es ist aber nicht sicher, ob die vier Familien ohne Hämocyanine tatsächlich keins aufweisen oder dieser Befund auf die verfügbaren Daten zurückzuführen ist. Weitere Untersuchungen müssten hier noch erfolgen. Es steht die Untersuchung der weiteren 25 Familien der Vetigastropoden auf Hämocyanine noch aus.

Da nur eine Spezies der Bivalvia *N. nucleus* in meiner phylogenetischen Untersuchung eingeschlossen war, ist die Position als Schwester-Taxon zu Polyplacophora + Monoplacophora + Cephalopoda nicht gut unterstützt und für Bivalvia ist keine Aussage zur Position innerhalb der Mollusken möglich.

Zu den Scaphopoden kann hier festgestellt werden, dass keine der sechs Spezies über Hämocyanin-Transkriptome in den Proben verfügte. Scaphopoda divergierten von Gastropoden vor ca. 473 Ma (Kocot et al. 2020) bzw. von Bivalvia vor 522-517 Ma (Song et al. 2023), wobei die Verwandtschaft nicht von allen Wissenschaftlern so gesehen wird. Scaphopoda werden als Schwestertaxon zu Gastropoda (Kocot et al. 2020; Smith et al. 2011) oder zu Bivalvia (Osca et al. 2014) oder als Schwestertaxon zu Bivalvia + Gastropoda (Kocot et al. 2011; Zhang et al. 2023) angesehen. Für *G. tolmiei* war das Gewebe nicht angegeben und für *G. eborea*, *E. tetragona* und *A. entalis* wurden entweder ein ganzes Individuum oder der Mantel sequenziert. Nur für *G. eborea* und *E. tetragona* fand ich Hinweise auf Hämyerthrin in den Transkriptomdaten, was einer genaueren Untersuchung bedarf. Meine Erkenntnis aus meiner Arbeit ist, dass die Position nicht aufgeklärt ist und die Schwesterposition zu Gastropoda nicht als gesichert gelten kann. Eine Studie zu Metallothioninen, die wie Ferritine ubiquitär vorkommen, zeigte, dass die der Scaphopoda denen der Bivalvia ähneln und nicht denen der Gastropoden (Calatayud et al. 2021).

Noch schwieriger ist die Datenlage für die Solenogastres, die weniger artenreich wie Scaphopoda sind. Für die zwei hier untersuchten Spezies ließ sich kein respiratorisches Protein in den Daten nachweisen. Die hier untersuchten Arten *M. fodiens* und *E. babai* stehen bei Kocot et al. (2019) in

entfernter Verwandtschaft, was eine mögliche Erklärung für die entfernte Positionierung hier im Phylogramm der Ferritin-Sequenzen sein könnte.

Die Analyse der Hämocyanin- und Ferritin-Sequenzen konnte die Phylogenie der Mollusken nicht weiter auflösen.

5. Fazit

Meine Arbeit trug zur Erforschung der Hämocyanin- und Ferritin-Sequenzen in Mollusken bei. Ich konnte einen neuen Hämocyanin-Typ in den Peltospiridae-Arten *C. squamiferum* und *G. aegis* entdeckt. Dieser neue Hämocyanin-Typ unterscheidet sich von den anderen Typen durch eine Triplikation der FU-c und weist somit 11 statt der verbreiteten acht FUs auf. Neben dem Mega-Hämocyanin Typ mit der mehrfachen Duplikation der FU-f zeigte auch dieser Hämocyanin-Typ, dass Mollusken über diversere Hämocyanin-Typen verfügen, als bekannt ist. Es konnten keine weiteren respiratorischen Proteine in Mollusken in den hier untersuchten Arten bestätigt werden, wobei es Hinweise auf vereinzelt Hämerythrin in Scaphopoda und Solenogastres gibt.

Die Auswertung und Assemblierung der Rohdaten war nicht immer möglich und hängt von der Datenqualität und dem Expressions-Niveau ab, mit den entsprechenden Genom-Daten konnte aber in manchen Fällen der Nachweis eines (zweiten) Hämocyanin-Gens erbracht werden.

Die phylogenetischen Untersuchungen sind für Hämocyanine nicht für alle Klassen möglich, da einige kein Hämocyanin aufweisen. Für Ferritin gilt zwar, dass es ubiquitär vorliegt, aber aufgrund der zahlreichen Isoformen war eine phylogenetische Untersuchung nicht möglich. Es gelang mir nicht die orthologe Ferritin-Sequenzen zu bestimmen. Einige Spezies haben bis zu vier Ferritin-Isoformen, was die Auswertung erschwerte. Bis auf wenige Ausnahmen konnte aus den Rohdaten jeweils nur eine Isoform assembliert werden, obwohl anzunehmen war, dass mehr als eine vorliegt. Neben der Datenqualität ist auch die Probenprozessierung und das Probengewebe für den Erfolg und die Aussagekraft der Assemblierung wichtig. Für die weitere Analyse müssen die Gene und Expressionsmuster erforscht werden, ob die jeweiligen Befunde richtig sind.

6. Ausblick

Betrachtet man die große Artenvielfalt der Mollusken mit ihrer großen Diversität und das dem gegenüberstehenden Wissen über diese Lebewesen, wird offensichtlich, dass bisher immer noch nur wenig über diese Tiere bekannt ist. Die Auswertung der kontinuierlich generierten Sequenz-Daten bietet die Möglichkeit mit wenigen Kosten und ohne erneute Probennahme diverse Forschungsfragen auf der Ebene von Gen- oder Transkriptom-Sequenzen zu erforschen. Meine

Arbeit hat gezeigt, dass so in diesem Rahmen wichtige Erkenntnisse gewonnen werden können. Weitere Forschungen mittels morphologischer und molekularer Daten werden nötig sein, um auch weitere Erkenntnisse für die Evolution der Mollusken zu generieren. Mollusken bleiben ein spannendes und weites Forschungsfeld. Meine Ergebnisse zeigten, dass noch weitere Hämocyanin-Typen entdeckt werden können. Diese Ergebnisse sind die Grundlage, um weiterführende Fragen z.B. nach der Anpassungsfähigkeit der Organismen auf sich ändernde Umwelteinflüsse zu beantworten. Es ist weiterhin viel zu tun und es bleibt weiterhin spannend.

Anhang

Tabelle 8: Liste der Spezies mit Accession-Nummern für de novo Assemblierungen Hämocyanine, Hämoglobin, Hämerythrin und Ferritin

Akzeptierter Name	Spezies	Accession Nummer
	<i>Acanthochitona fascicularis</i>	SRR13862575
	<i>Acanthochitona rubrolineata</i>	SRR8442643
	<i>Acanthopleura granulata</i>	SRR11584256
	<i>Acanthopleura lochooana</i>	SRR15694065
	<i>Acharax bartschii</i>	SRR8217839
	<i>Amblychilepas nigrata</i>	SRR15563600
Angaria exasperata	<i>Angaria nodosa</i>	SRR15563599
	<i>Antalis entalis</i>	SRR330084
	<i>Antalis vulgaris</i>	SRR108988
	<i>Arca noae</i>	SRR1559268
	<i>Arene cruentata</i>	SRR15563588
	<i>Argopecten irradians irradians</i>	SRR9190187
	<i>Argopecten purpuratus</i>	SRR21093221
	<i>Astarte sulcata</i>	SRR1559270
	<i>Astralium</i>	SRR15563566
	<i>Austrocochlea porcata</i>	SRR15563564
	<i>Bathyacmaea lactea</i>	SRR18045285
Neocollonia pilula	<i>Bothropoma pilula</i>	SRR15563563
	<i>Callochiton</i>	SRR11674125
	<i>Cantharidus japonicus</i>	SRR15563562
	<i>Cantrainea macleani</i>	SRR15563561
	<i>Chaetoderma nitidulum</i>	SRR5341487
Rhysoplax olivacea	<i>Chiton olivaceus</i>	SRR618506
	<i>Choneplax lata</i>	SRR13010088
	<i>Chrysomallon squamiferum</i>	SRR8599693
	<i>Chrysostoma paradoxum</i>	SRR15563560
	<i>Cittarium pica</i>	SRR15563598
	<i>Cristaria plicata</i>	SRR2175868
	<i>Cryptoplax japonica</i>	SRR13010086
	<i>Diodora listeri</i>	SRR15563597
	<i>Emarginula sp.</i>	SRR15563596
	<i>Ennucula tenuis</i>	SRR331123
	<i>Entalina tetragona</i>	SRR2057018
	<i>Epimения babai</i>	SRR6926338
Eurytrochus affinis	<i>Eurytrochus cognatus</i>	SRR15563594
	<i>Falcidens caudatus</i>	SRR6926337
	<i>Falcidens sagittiferus</i>	SRR6926339
	<i>Fissurella nodosa</i>	SRR15563593
	<i>Gadila tolmiei</i>	SRR331897
	<i>Gigantopelta aegis</i>	SRR13131431

	<i>Gigantopelta aegis</i>	SRR13131432
	<i>Graptacme eborea</i>	SRR2057020
	<i>Haliotis laevigata</i>	SRR6678007
	<i>Haliotis tuberculata</i>	SRR2599646
	<i>Hanleya hanleyi</i>	SRR11674123
	<i>Hemitoma octoradiata</i>	SRR15563592
	<i>Komaitrochus</i>	T. Cunha
	<i>Laevipilina hyalina</i>	SRR330425
	<i>Laevipilina hyalina</i>	SRR1505115
	<i>Lepetodrilus pustulosus</i>	SRR8318356
	<i>Lepidopleurus cajetanus</i>	SRR8245857
	<i>Leptochiton asellus</i>	SRR22572835
	<i>Leptochiton asellus</i>	SRR11674122
<i>Liotinaria semicltrathratura</i>	<i>Liotina semicltrathratura</i>	SRR15563589
	<i>Lithopoma tectum</i>	SRR15563587
	<i>Lottia fenestrata</i>	SRR8318352
	<i>Lucapina suffusa</i>	SRR15563586
	<i>Lunella coronata</i>	SRR15563585
<i>Arene tricarinata</i>	<i>Marevalvata tricarinata</i>	SRR15563577
	<i>Margarella refulgens</i>	SRR15563584
<i>Pinctada margaritifera</i>	<i>Margaritifera margaritifera</i>	SRR5230928
	<i>Megaloniaias nervosa</i>	SRR12244630
	<i>Micromenia fodiens</i>	SRR6926322
	<i>Montfortula rugosa</i>	SRR15563582
	<i>Munditiella ammonoceras</i>	SRR15563581
	<i>Myochama anomioides</i>	SRR1560429
	<i>Nautilus pompilius</i>	SRR13131288
	<i>Neotrigonia lamarckii</i>	SRR8217856
	<i>Neotrigonia margaritacea</i>	SRR1560432
	<i>Nucella lapillus</i>	SRR999591
	<i>Nuttallochiton mirandus</i>	SRR11674133
<i>Tegula pfeiffri</i>	<i>Omphalius pfeifferi</i>	SRR15563580
	<i>Perotrochus lucaya</i>	SRR15563579
	<i>Pinctada imbricata</i>	SRR18491444
	<i>Polyschides</i>	SRR108992
	<i>Potamilus streckersoni</i>	SRR13176628
<i>Spathoderma californicum</i>	<i>Prochaetoderma californicum</i>	SRR6926326
	<i>Prochaetoderma californicum</i>	AG Daten
	<i>Puncturella</i>	SRR15563578
	<i>Pyropelta</i> sp.	SRR15563576
	<i>Scutopus ventrolienatus</i>	AG Daten
	<i>Scutopus ventrolienatus</i>	SRR108982
	<i>Semisulcospira reiniana</i>	DRR346023
	<i>Semisulcospira reiniana</i>	DRR346023
<i>Sepiella inermis</i>	<i>Sepiella maindroni</i>	SRR13452112
	<i>Sinezona</i> sp.	SRR15563573

	Sinosolenia oleivora	SRR15505917
	Siphonodentalium dalli	SRR23008380
	Spathoderma clenchi	SRR8258011
	Stenoplax bahamensis	SRR13010087
	Stomatia phymotis	SRR15563571
	Stomatolina sanguinea	SRR15563570
Rochia nilotica	Tectus niloticus	SRR15563575
	Tegillarca granosa	SRR18671877
Agathistoma fasciatum	Tegula fasciata	SRR15563569
	Tonicella lineata	SRR6926331
	Trochus maculatus	SRR15563568
	Turbo argyrostomus	SRR15563567
	Umbonium giganteum h1 partial	SRR15563565

Befehle zum Download der Rohdaten in Windows 10/11 Eingabeaufforderung:

```
C:\Users\Acer>C:\sratoolkit.2.9.6-1-win64\bin\prefetch --max-size 100000000 SRRXXXXXX
```

```
C:\sratoolkit.2.9.6-1-win64\bin>fastq-dump SRRXXXXXX
```

Tabelle 9: Assemblierte Hämocyanin-Sequenzen mit Spezies, dem akzeptierten Namen nach W.O.R.M.S, der Isoform, der Accession-Nummer und der Länge des ORF in bp

Akzeptierter Name	Spezies	Isoform	Accession Nummer	Länge ORF in bp
	Acanthochitona rubrolineata	h 1	SRR8442643	10263 bp
	Acanthopleura granulata	h 1	SRR11584256	10317 bp
	Acanthopleura loochooana	h 1	SRR15694065	10278 bp
Angaria exasperata	Angaria nodosa	h 1	SRR15563599	1176 bp
	Arene cruentata	h 1	SRR15563588	2682 bp
	Astralium	h 1	SRR15563566	4228 bp
	Austrocochlea porcata	h 1	SRR15563564	10242 bp
	Callochiton		SRR11674125	639bp
	Cantharidus japonicus	h 1	SRR15563562	1944 bp
	Chaetoderma nitidulum		SRR5341487	1998 bp
	Chiton olivaceus	h 1	SRR618506	3267 bp
	Chrysomallon squamiferum	h 1	SRR8599693	10290 bp
	Chrysomallon squamiferum	h 2	SRR8599693	14085 bp
	Chrysostoma paradoxum	h 1	SRR15563560	7608 bp
	Cittarium pica	h 1	SRR15563598	2622 bp
	Cristaria plicata		SRR2175868	4584 bp
	Diodora listeri	h 1	SRR15563597	6714 bp

	<i>Ennucula tenuis</i>	h 1	SRR331123	2997 bp
<i>Eurytrochus affinis</i>	<i>Eurytrochus cognatus</i>	h 1	SRR15563594	1662 bp
	<i>Falcidens caudatus</i>	h 1	SRR6926337	1560 bp
	<i>Falcidens sagittiferus</i>		SRR6926339	4422 bp
	<i>Fissurella nodosa</i>	h 1	SRR15563593	4596 bp
	<i>Gigantopelta aegis</i>	h 1	SRR13131431	10212 bp
	<i>Gigantopelta aegis</i>	h 2	SRR13131432	13953 bp
	<i>Haliotis laevigata</i>	h 1	SRR6678007	2214 bp
	<i>Hanleya hanleyi</i>	h 1	SRR11674123	2010 bp
	<i>Hemitoma octoradiata</i>	h 1	SRR15563592	10275 bp
	<i>Komaitrochus</i>	h 1	T. Cunha	2994 bp
	<i>Laevipilina hyalina</i>	h 1	SRR1505115	10293 bp
	<i>Lepidopleurus cajetanus</i>	h 1	SRR8245857	10302 bp
	<i>Leptochiton asellus</i>	h 1	SRR22572835	10353 bp
<i>Liotinaria semiclathratula</i>	<i>Liotina semiclathratula</i>	h 1	SRR15563589	2700 bp
	<i>Lithopoma tectum</i>	h 1	SRR15563587	1044 bp
	<i>Lunella coronata</i>	h 1	SRR15563585	2037 bp
	<i>Munditiella ammonoceras</i>	h 1	SRR15563581	8679 bp
<i>Tegula pfeiffri</i>	<i>Omphalius pfeifferi</i>	h 1	SRR15563580	1149 bp
	<i>Puncturella</i>	h 1	SRR15563578	10296 bp
	<i>Pyropelta</i> sp.	h 1	SRR15563576	2001 bp
	<i>Semisulcospira reiniana</i>	h 1	DRR346023	10311 bp
	<i>Semisulcospira reiniana</i>	h 2	DRR346023	10368 bp
	<i>Sinezona</i> sp.	h 1	SRR15563573	4368 bp
	<i>Stenoplax bahamensis</i>	h 1	SRR13010087	4872 bp
<i>Rochia nilotica</i>	<i>Tectus niloticus</i>	h 1	SRR15563575	2046 bp
<i>Agathistoma fasciatum</i>	<i>Tegula fasciata</i>	h 1	SRR15563569	1506 bp
	<i>Turbo argyrostomus</i>	h 1	SRR15563567	3411 bp
	<i>Umbonium giganteum</i> h1	h 1	SRR15563565	6603 bp

Tabelle 10: Liste der Hämocyanin-Sequenzen mit Angabe der Spezies, der Isoform, Accession-Nummer oder SRA-Accession und der Länge der Sequenz in bp für die Alignments und die Phylogenetischen Untersuchungen

Spezies	Isoform	Accession Nummer	Hämocyanin Länge in bp
<i>Acanthochitona rubrolineata</i>	h 1	SRR8442643	10263 bp
<i>Acanthopleura granulata</i>	h 1	SRR11584256	10317 bp
<i>Acanthopleura loochooana</i>	h 1	SRR15694065	10278 bp
<i>Aplysia californica</i>	h 1	BK010575.1	10299 bp
<i>Aplysia californica</i>	h 2	BK010576.1	9888 bp
<i>Aplysia californica</i>	h1	AJ556169.1	10299 bp
<i>Austrocochlea porcata</i>	h 1	SRR15563564	10242 bp
<i>Chrysomallon squamiferum</i>	h 1	SRR8599693	10287 bp
<i>Chrysomallon squamiferum</i>	h 2	SRR8599693	14085 bp
<i>Cornu aspersum</i>	h 2	MH485357.1	10302 bp
<i>Cornu aspersum</i>	h 1	MH485356.1	10299 bp
<i>Crepidula fornicata</i>	h 1	OQ309180.1	10299 bp
<i>Crepidula fornicata</i>	h 2	OQ309181.1	9867 bp
<i>Euprymna scolopes</i>	h 1	KF647898.1	10244 bp
<i>Euprymna scolopes</i>	h 2	KF647897.1	10294 bp
<i>Gigantopelta aegis</i>	h 1	SRR13131431	10212 bp
<i>Gigantopelta aegis</i>	h 2	SRR13131432	13953 bp
<i>Haliotis discus hannai</i>	h 1	MG767306.1	10263 bp
<i>Haliotis discus hannai</i>	h 2	MG767307.1	10347 bp
<i>Haliotis rubra</i>	h 1	KU496942.1	10266 bp
<i>Haliotis rubra</i>	h 2	KU496943.1	10283 bp
<i>Haliotis tuberculata</i>	h 1	Y13219.2	8000 bp
<i>Hemitoma octoradiata</i>	h 1	SRR15563592	10275 bp
<i>Laevipilina hyalina</i>	h 1	SRR1505115	10293 bp
<i>Lepidochitona cinerea</i>	h 1	AG Daten	10251 bp
<i>Lepidopleurus cajetanus</i>	h 1	SRR8245857	10302 bp
<i>Leptochiton asellus</i>	h 1	SRR22572835	10353 bp
<i>Lymnaea stagnalis</i>	h 1	MH485363.1	10311 bp
<i>Lymnaea stagnalis</i>	h 2	MH485364.1	10290 bp
<i>Megathura crenulata</i>	h 1	AJ698339.2	10245 bp
<i>Megathura crenulata</i>	h 2	AJ698340.1	10272 bp
<i>Melanoides tuberculata</i>	h 1	KC405575.1	10338 bp
<i>Melanoides tuberculata</i>	h 2	KC405576.1	15000 bp
<i>Munditiella ammonoceras</i>	h 1	SRR15563581	8679 bp
<i>Nautilus pompilius</i>	h 1	AJ619741.1	8802 bp

<i>Nucella lapillus</i> (Linnaeus, 1758)	h 1	MT939254.1	10326 bp
<i>Nucella lapillus</i> (Linnaeus, 1758)	h 2	MT939255.1	11310 bp
<i>Nucula nucleus</i>	h 1	AJ786639.1	11090 bp
<i>Nucula nucleus</i>	h 2	AJ786640.1	10849 bp
<i>Octopus dofleini</i>	h 1	AF020548.1	8806 bp
<i>Puncturella</i>	h 1	SRR15563578	10284 bp
<i>Rapana venosa</i>	h 1	BK014286.1	10323 bp
<i>Rapana venosa</i>	h 2	BK014287.1	10662 bp
<i>Semisulcospira reiniana</i>	h 1	DRR346023	10311 bp
<i>Semisulcospira reiniana</i>	h 2	DRR346023	10326 bp
<i>Sepia officinalis</i>	h 1	DQ388569.1	10079 bp
<i>Sepiella maindroni</i>	h 1	KF152913.1	10083 bp

Tabelle 11: Resultate "find best model" MEGA X aus dem Alignment der einzelnen FUs mit Peltospiridae

Model	#Param	BIC	AICc	InL	Invariant	Gamma	Freq A
LG+G+I	107	55282,55317	54427,67862	-27106,31173	0,010840176	1,223764733	0,079066
LG+G	106	55284,54574	54437,65094	-27112,30769	n/a	1,162481865	0,079066
WAG+G+F	125	55324,88733	54326,40872	-27037,48472	n/a	1,319733924	0,063147374
WAG+G+I+F	126	55327,95829	54321,50343	-27034,02053	0,008656433	1,380418557	0,063147374
WAG+G	106	55344,924	54498,0292	-27142,49682	n/a	1,346148502	0,0866279
WAG+G+I	107	55346,47624	54491,60169	-27138,27327	0,009370741	1,415372147	0,0866279
LG+G+F	125	55362,78293	54364,30433	-27056,43253	n/a	1,118882792	0,063147374
LG+G+I+F	126	55363,57949	54357,12464	-27051,83114	0,01059441	1,17049999	0,063147374
rtREV+G+I+F	126	55547,99805	54541,5432	-27144,04041	0,010027819	1,193407371	0,063147374

Tabelle 12: Resultate find best model aus MEGA X mit dem Alignment der Hämocyanin-Sequenzen der Mollusken FU-b bis FU-g, hier ein Auszug der besten Modelle.

Model	#Param	BIC	AICc	InL	Invariant	Gamma
WAG+G+I+F	112	222821,1581	221739,2401	-110757,5109	0,093454049	1,275753224
LG+G+I+F	112	222847,3467	221765,4287	-110770,6052	0,087551644	1,094199496
WAG+G+F	111	222899,6602	221827,4002	-110802,5929	n/a	0,852114371
LG+G+F	111	222907,0183	221834,7583	-110806,2719	n/a	0,779921828
LG+G+I	93	223370,0995	222471,6906	-111142,7699	0,084392901	1,08010986
LG+G	92	223422,5723	222533,8222	-111174,8373	n/a	0,781045078
WAG+G+I	93	223460,5453	222562,1364	-111187,9928	0,092526127	1,277671809
WAG+G	92	223538,0922	222649,3421	-111232,5973	n/a	0,859852029
rtREV+G+I+F	112	224134,4647	223052,5466	-111414,1642	0,088665617	1,110138566
rtREV+G+F	111	224199,3397	223127,0797	-111452,4326	n/a	0,77954233
Dayhoff+G+I+F	112	224652,3765	223570,4584	-111673,1201	0,083604104	1,147218934
Dayhoff+G+F	111	224726,012	223653,7521	-111715,7688	n/a	0,81622947
JTT+G+I+F	112	224900,7828	223818,8648	-111797,3233	0,090658119	1,14913627
JTT+G+F	111	224972,6592	223900,3992	-111839,0924	n/a	0,804706035
Dayhoff+G+I	93	225253,5563	224355,1474	-112084,4983	0,083597385	1,176145973
Dayhoff+G	92	225328,2889	224439,5388	-112127,6956	n/a	0,839083657
rtREV+G+I	93	225421,4292	224523,0204	-112168,4348	0,088405132	1,134704747
rtREV+G	92	225489,7835	224601,0333	-112208,4429	n/a	0,792721449
JTT+G+I	93	225671,2257	224772,8168	-112293,333	0,087893857	1,146246248
JTT+G	92	225738,2119	224849,4618	-112332,6571	n/a	0,814760832

Tabelle 13: Liste der Rohdaten und der Accession-Nummern der Ferritine der untersuchten Spezies, Accession-Nummer, der Sequenzlänge des ORF der Ferritin-cDNA-Sequenzen (no¹steht für „keine Contigs gefunden“, no* entspricht keiner erfolgreichen Assemblierung), dem Probengewebe falls angegeben und dem Habitat. Grün markierte Sequenzen wurden in die Assemblierungen und Phylogenetischen Untersuchungen eingeschlossen.

Spezies	Acc-Nr.	Ferritin	Probengewebe	Habitat
Acanthochitona fascicularis	SRR13862575	no*	Larve	marin
Acanthochitona rubrolineata	SRR8442643	552	adult	marin
Acanthopleura granulata	SRR11584256	525	Fuß, ein Individuum	marin
Acanthopleura loochooana	SRR15694065	525	Fuß	marin
Acharax bartschii	SRR8217839	213	Mantel	marin
Amblychilepas nigrita	SRR15563600	519	tissue N/A	marin
Angaria nodosa	SRR15563599	519	Fuß	marin
Antalis entalis	SRR330084	519	tissue N/A	marin
Antalis vulgaris	SRR108988	no ¹	ein Individuum	marin
Aplysia californica	NM_001204732.1	519		marin
Arca noae	SRR1559268	519	adult Mantel/Fuß	marin
Arene cruentata	SRR15563588	522	tissue N/A	marin
Argopecten irradians irradians	SRR9190187	522	adult Blut	marin
Argopecten purpuratus	KT895278.1	516		marin
Argopecten purpuratus	KT895279.1	522		marin
Astarte sulcata	SRR1559270	519	adult Mantel/Fuß	marin
Astralium	SRR15563566	519	Fuß, ein Tier	marin
Austrocochlea porcata	SRR15563564	519	tissue N/A	marin
Bothropoma pilula	SRR15563563	540	ganzes Tier	marin
Callochiton	SRR11674125	522	ganzes Tier	marin
Callochiton septemvalvis	SRR13010089	no*	Fuß	marin
Cantharidus japonicus	SRR15563562	519	tissue N/A	marin
Cantrainea macleani	SRR15563561	519	tissue N/A	marin
Chaetoderma nitidulum	SRR5341487	516	juvenile, ganzes Tier	marin
Chiton olivaceus	SRR618506	525	Mantel	marin
Cheinpax lata	SRR13010088	519	Fuß	marin
Chrysomallon squamiferum	SRR8599693	516	Adult, Blutgefäß	marin
Chrysostoma paradoxum	SRR15563560	519	Fuß	marin
Cittarium pica	SRR15563598	519	Fuß, ein Tier	marin
Conus ebraeus	KY963315.1	519		marin
Conus ermineus	MH360399.1	522		marin
Conus frigidus	KY765615.1	519		marin
Cornu aspersum	SRR14200903	690		terrestrisch
Crepidula fornicata	SRR14267599	516		marin
Cristaria plicata	SRR2175868	519	viceral Masse	limnisch
Cryptoplax japonica	SRR13010086	522	Fuß	marin
Diodora listeri	SRR15563597	540	Fuß	marin
Emarginula sp.	SRR15563596	519	tissue N/A	marin
Ennucula tenuis	SRR331123	513	tissue N/A	marin
Entalina tetragona	SRR2057018	no*	adult 1 Tier	marin
Epimения babai	SRR6926338	543	Teil des mittleren Körpers, mit Mantelgewebe angereichert	marin
Euprymna scolopes	SRR8159239	no ¹	Kiemen	marin

<i>Eurytrochus cognatus</i>	SRR15563594	519	Fuß	marin
<i>Falcidens caudatus</i>	SRR6926337	531	ganzes Tier	marin
<i>Falcidens sagittiferus</i>	SRR6926339	534	ganzes Tier	marin
<i>Fissurella nodosa</i>	SRR15563593	519	Fuß	marin
<i>Gadila tolmiei</i>	SRR331897	513	tissue N/A	marin
<i>Gigantopelta aegis</i>	SRR13131431	522	Fuß ein Tier	marin
<i>Graptacme eboarea</i>	SRR2057020	528	adult 1 Tier	marin
<i>Haliotis discus hannai</i>	DQ845482.1	516	Mantel	marin
<i>Haliotis laevigata</i>	SRR6678007	633	Mantel	marin
<i>Haliotis rubra</i>	SRR7811718	no*		marin
<i>Haliotis rufescens</i>	GU191936.1	516		marin
<i>Haliotis tuberculata</i>	SRR2599646	516	Mantel/ Hämolymphe adulte	marin
<i>Hanleya hanleyi</i>	SRR11674123	no ¹		marin
<i>Hemitoma octoradiata</i>	SRR15563592	519	Fuß	marin
<i>Komaitrochus</i>	not public available	513		marin
<i>Laevipilina hyalina</i>	SRR330425	516	tissue N/A	marin
<i>Lepetodrilus pustulosus</i>	SRR8318356	642		marin
<i>Lepidopleurus cajetanus</i>	SRR8245857	543	adult Muskel	marin
<i>Leptochiton asellus</i>	SRR11674122	525	Mantel	marin
<i>Liolophura japonica</i>	AB006447.1	672	Leber	marin
<i>Liotina semiclyathrata</i>	SRR15563589	519	ganzes Tier	marin
<i>Lottia fenestrata</i>	SRR8318352	no ¹	tissue N/A	marin
<i>Lucapina suffusa</i>	SRR15563586	519	tissue N/A	marin
<i>Lunella coronata</i>	SRR15563585	519	Fuß	marin
<i>Lymnaea stagnalis</i>	X56778.1	525	visceral Masse	brackw., limnisch
<i>Marevalvata tricarinata</i>	SRR15563577	519	tissue N/A	marin
<i>Margarella refulgens</i>	SRR15563584	519	tissue N/A	marin
<i>Margaritifera margaritifera</i>	SRR5230928	519	Niere	limnisch
<i>Megaloniais nervosa</i>	SRR12244630	525	multiple Gewebe adult	limnisch
<i>Melanoides tuberculata</i>	SRR9056081	171	adult, ganzes Tier	limnisch
<i>Micromenia fodiens</i>	SRR6926322	519		
<i>Montfortula rugosa</i>	SRR15563582	519	tissue N/A	marin
<i>Munditiella ammonoceras</i>	SRR15563581	516	ganzes Tier	marin
<i>Myochama anomioides</i>	SRR1560429	513	adult Mantel/Fuß	marin
<i>Nautilus pompilius</i>	SRR13131288	519	Muskel	marin
<i>Neotrigonia lamarckii</i>	SRR8217856	519	Mantel	marin
<i>Neotrigonia margaritacea</i>	SRR1560432	519	adult Mantel/Fuß	marin
<i>Nucella lapillus</i>	SRR999591	567		marin
<i>Nuttallochiton mirandus</i>	SRR11674133	519	Gürtel	marin
<i>Octopus dofleini</i>	AF117271.1	519		marin
<i>Omphalius pfeifferi</i>	SRR15563580	519	Fuß	marin
<i>Pinctada fucata ferritin-like</i>	AF547223.1	621		marin
<i>Pinctada imbricata</i>	SRR18491444	522	Mantel	marin
<i>Polyschides</i>	SRR108992	no ¹		marin
<i>Potamilus streckeri</i>	SRR13176628	525	Mantel	limnisch
<i>Prochaetoderma californicum</i>	SRR6926326	513	ganzes Tier	marin
<i>Puncturella</i>	SRR15563578	519	tissue N/A	marin

Pyropelta sp.	SRR15563576	519	tissue N/A	marin
Rapana venosa	SRR23649037	519		marin
Ruditapes philippinarum	KF017278.1	513		marin
Scrobicularia plana	JQ959539.1	525		marin
Scutopus ventrolienatus	Bernd	534	Hämolymphe	marin
Scutopus ventrolienatus	SRR108982	no ¹	2 ganze Tiere	marin
Semisulcospira reiniana	DRR346023	519	tissue N/A	limnisch
Sepia officinalis	SRR10843375	525	Schale	marin
Sepiella maindroni	SRR13452112	609	Tintensack	marin
Sepiella maindroni	JX401574.1	516		marin
Sinosolenia oleivora	SRR15505917	534	Kiemen	limnisch
Siphonodentalium dalli	SRR23008380	no*		
Spathoderma clenchi	SRR8258011	516	1 Tier	marin
Stenoplax bahamensis	SRR13010087	525	Fuß	marin
Stomatia phymotis	SRR15563571	519	Fuß	marin
Stomatolina sanguinea	SRR15563570	519	Fuß	marin
Tectus niloticus	SRR15563575	513	Fuß	marin
TeKiemenarca granosa	GU078657.1	519	Hämocyte	marin, brackw.
Tegula fasciata	SRR15563569	513	tissue N/A	marin
Tonicella lineata	SRR6926331	546	Mantel	marin
Tritonia diomedea	EU906914.1	543		marin
Trochus maculatus	SRR15563568	519	Fuß	marin
Turbo argyrostomus	SRR15563567	519	Fuß	marin

Tabelle 14: „Find best Model“ aus dem Alignment der Ferritine mit AS 98 Sequenzen MEGAX Ausschnitt aus Ergebnis

Model	#Param	BIC	AICc	lnL	Invariant	Gamma
LG+G	194	20036,1268	18539,06809	-9073,280783	n/a	0,695088308
LG+G+I	195	20042,40435	18537,65234	-9071,549541	0	0,69429633
WAG+G	194	20170,07334	18673,01463	-9140,254053	n/a	0,732429967
WAG+G+I	195	20175,05445	18670,30244	-9137,874594	0,00001	0,728695521
LG+G+F	213	20274,47394	18631,28433	-9099,924096	n/a	0,699937816
LG+G+I+F	214	20280,30056	18629,42229	-9097,96739	0,00001	0,699206282
Dayhoff+G	194	20282,61282	18785,55411	-9196,523792	n/a	0,705761512
rtREV+G	194	20283,86411	18786,80539	-9197,149436	n/a	0,725248242
Dayhoff+G+I	195	20287,32061	18782,5686	-9194,007673	0	0,700548249
rtREV+G+I	195	20289,9545	18785,20249	-9195,324617	0,00001	0,724385559
JTT+G	194	20313,79248	18816,73377	-9212,113622	n/a	0,715898416
JTT+G+I	195	20319,57155	18814,81954	-9210,133144	0	0,714905744
rtREV+G+F	213	20397,586	18754,39639	-9161,480126	n/a	0,716824175
rtREV+G+I+F	214	20405,62779	18754,74951	-9160,631003	0,00001	0,716621885
WAG+G+F	213	20542,99295	18899,80333	-9234,183599	n/a	0,678297248
WAG+G+I+F	214	20552,73623	18901,85796	-9234,185227	0,00001	0,679391157
JTT+G+F	213	20566,99767	18923,80806	-9246,18596	n/a	0,696977601
JTT+G+I+F	214	20576,73974	18925,86147	-9246,186979	0,002311639	0,702731957

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 KLADOGRAMM DER ACHT MOLLUSKEN-KLASSEN MIT ANGABE DER HABITATE UND DER ANZAHL REZENTER ARTEN NACH (W.O.R.M.S) ADAPTIERT NACH SMITH ET AL. (2011) UND KOCOT ET AL. (2011).	9
ABBILDUNG 3 BEISPIELE DER GASTROPODEN: 1) LISSACHATINA FULICA , FRANCISCO V. BEZERRA NETO PUBLISHER INATURALIST RECORD LICENCE HTTP://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-NC/4.0/ REFERENCES HTTPS://WWW.INATU.../PHOTOS/344564374 , 2) LYMNAEA STAGNALIS HTTPS://COMMONS.WIKIMEDIA.ORG/WIKI/FILE:WATER_SNAIL_REX_2.JPG HTTP://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-NC/4.0/ , 3) RUMINA DECOLLATA KRISTIN SWEENEY, PUBLISHER INATURALIST, RECORD LICENCE HTTP://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-NC/4.0/ REFERENCES HTTPS://WWW.INATU.../PHOTOS/344582525 , 4) CHROMODORIS ELISABETHINA, AFGUEMAS PUBLISHER INATURALIST RECORD LICENCE HTTP://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-NC/4.0/ REFERENCES HTTPS://WWW.INATU.../PHOTOS/344041099 , 5) AUSTROCOCHLEA PORCATA , SMILELYNAOMI PUBLISHER INATURALIST RECORD HTTP://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-NC/4.0/ , REFERENCES HTTPS://WWW.INATU.../PHOTOS/343871482 6) LIMAX MAXIMUS , ALANAWYLIE PUBLISHER INATURALIST RECORD LICENCE HTTP://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-NC/4.0/ REFERENCES HTTPS://WWW.INATU.../PHOTOS/343746801	12
ABBILDUNG 4 PELTOSPIRIDAE SPEZIES CHRYSOMALLON SQUAMIFERUM LINKS (PERSÖNLICHE ÜBERLASSUNG VON CHONG CHEN) UND GIGANTOPELTA AEGIS RECHTS ZOOLOG. J. LINNAEAN SOC. - VOL. 175, P 327,.....	13
ABBILDUNG 5: VERSCHIEDENE VERTRETER DER BIVALVIA: 1) GARI FERVENSIS (GMELIN, 1791) FRANS SLIEKER, (W.O.R.M.S), 2) LIMARIA TUBERCULATA (OLIVI, 1792), EL BOUCHIKHI, KHADIJA, (W.O.R.M.S) , 3) LOPHA CRISTAGALLI (LINNAEUS, 1758) PAULAY, GUSTAV (W.O.R.M.S), 4) CHLAMYS ISLANDICA (O. F. MÜLLER, 1776) NOZÈRES, CLAUDE, ALLE UNTER LIZENZ HTTPS://CREATIVECOMMONS.ORG/	15
ABBILDUNG 6 EIN VERTRETER DER CAUDOFOVEATA IST CHAETODERMA NITIDULUM (LOVÉN, 1844), MIT DEN TYPISCHEN SCLERITEN AUF DER KÖRPEROBERFLÄCHE, DIE WIE EIN FELL AUSSEHEN KÖNNEN (W.O.R.M.S) LIZENZ HTTPS://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-NC-SA/4.0/	16
ABBILDUNG 7 ÜBERSICHT VON VERTRETEREN DER CEPHALOPODEN: 1) ROSSIA MACROSOMA , PICTON, BERNARD (W.O.R.M.S), 2) SEPIA OFFICINALIS , ROSIER, GAYNOR, (W.O.R.M.S) 3) LOLIGO VULGARIS , PILLON, ROBERTO (W.O.R.M.S), 4) CALLISTOCTOPUS MACROPUS PILLON, ROBERTO (W.O.R.M.S), 5) NAUTILUS POMPILIUS , HILLEWAERT, HANS, (W.O.R.M.S), 6) CALLISTOCTOPUS MACROPUS , PILLON, ROBERTO, (W.O.R.M.S), ALLE UNTER LIZENZ HTTPS://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-NC-SA/4.0/	17
ABBILDUNG 8 VERSCHIEDENE POLYPLACOPHOREN IN IHREN HABITATEN: 1) ACANTHOCHITONA FASCICULARIS , 2) TONICELLA LINEATA , 3) RHYSSOPLAX CORALLINA , 4) CALLOCHITON SEPTEMVALLIS , 5) CALLOCHITON SEPTEMVALLIS , 6) ISCHNOCHITON RISSOI , ALLE BILDER AUS (W.O.R.M.S) NACH DER LIZENZ HTTPS://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-NC-SA/4.0/	18
ABBILDUNG 9: DIE SCHALE VON GRAPTACME CALAMUS, (W.O.R.M.S) LIZENZ HTTPS://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-NC-SA/4.0/	19
ABBILDUNG 10: DER VERTRETER DER SOLENOGASTREN AMBOHERPIA HETEROTECTA HANDL & SALVINI-PLAWEN, 2002, MIT SEINEN HELLEN SPICULI, DIE WIE HAARE WIRKEN. QUELLE: WIKIPEDIA, LIZENZ SIEHE HTTPS://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-NC-SA/4.0/	20
ABBILDUNG 11 LINKS: PDB ID 4YD9: KRISTALLSTRUKTUR DES HÄMOCYANINS VON TODARODES PACIFICUS (MATSUNO ET AL. 2015), RECHTS: 4BED: KEYHOLE LIMPET HÄMOCYANIN (KLH): 9A CRYOEM STRUKTUR UND MOLEKULARES MODEL VON KLH1 DIDEKAMER, WELCHES DIE SCHNITTSTELLEN UND DIE KOMPLIZIERTE TOPOLOGIE DER 160 FUNKTIONSEINHEITEN DARSTELLT.	21
ABBILDUNG 12 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER „FUNKTIONELLEN EINHEITEN“ (FU) DER BISHER BEKANNTEN HÄMOCYANIN-TYPEN: SQUID-TYP (SEPIIDAE), NAUTILUS-TYP IN NAUTILIDAE UND OCTOPODIDAE (BERGMANN ET AL. 2006; GATSOGIANNIS ET AL. 2007; MARKL 2013; MILLER ET AL. 1998; LAMY ET AL. 1987), MEGAHÄMOCYANIN-TYP (CERITHIOIDAE) (SCHÄFER ET AL. 2021A; LIEB ET AL. 2010) UND KEYHOLE-LIMPET-TYP (FISSURELIDAE UND HALIOTIDAE) ADAPTIERT NACH (KATO ET AL. 2018; GEBAUER ET AL. 1999A). DIE FARBEN REPRÄSENTIEREN DIE JEWEILIGEN FUS, DIE SCHWARZEN STRICHE SYMBOLISIEREN DIE LINKERPEPTIDE, DIE DIE EINZELNEN FUS VERBINDEN. FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
ABBILDUNG 13 SCHEMA REPRÄSENTATIVER HÄMOCYANIN-GENSEQUENZ (HCS: HÄMOCYANINE, KLH=KEYHOLE LIMPET HÄMOCYANIN, HRH= HALIOTIS RUBRA, HTH= HALIOTIS TUBERCULATA HÄMOCYANIN) MIT DEM FARBSHEMA FÜR DIE	

ORTHOLOGEN FUS UND DEN INTERNEN INTRONS MIT PFEILEN IN WEIß, GRAU UND SCHWARZ (PHASE 0-2), LINKER INTRONS SIND IN GELB DARGESTELLT, NACH SCHÄFER ET AL. 2021B).	23
ABBILDUNG 14 MOLLUSKEN-FERRITIN IN 3D-DARSTELLUNG (6LIJ, CRASSOSTREA GIGAS FERRITIN) LINKS UND RECHTS IST EIN MONOMER MIT DEN VIER ALPHA-HELICES (LI ET AL. 2020) (EC: 1.16.3.1) BEISPIELHAFT HERAUSGESTELLT.	24
ABBILDUNG 15 KLADODIAGRAMM DER CEPHALOPODEN MIT SUBKLASSEN, SUPERORDNUNGEN, ORDNUNGEN ADAPTIERT NACH (LAMY ET AL. 1998) MIT ANGABE DES HÄMOCYANIN-TYPES UND DER ANZAHL BEKANNTER ISOFORMEN. FÜR VAMPYROMORPHA LAGEN KEINE DATEN VOR, DIE HYPOTHESE, DASS DIESE ORDNUNG EBENSO ÜBER ZWEI HÄMOCYANIN-ISOFORMEN VERFÜGT, IST HIER MIT DER GESTRICHELTEN KLAMMER DARGESTELLT. ADAPTIERT NACH BERGMANN ET AL. (2006; LAMY ET AL.).....	34
ABBILDUNG 16 UNGEWURZELTER BAUM (PHYML IN GENEIOUS® (LG+G+I BOOTSTRAP 100 (DEFAULT))), MIT DEN EINZELNEN FUS VON C. SQUAMIFERUM H 1 UND H 2 UND G. AEGIS H 2 NUMMIERT NACH DER POSITION IN DER AMINOSÄURE-SEQUENZ 1 BIS 8, BZW. 1 BIS 11, SOWIE DEN FUS DER FOLGENDEN HÄMOCYANIN-SEQUENZEN: S. OFFICINALIS, R. VENOSA H 2 UND KLH 1. DIE ORTHOLOGEN FUS SIND IN DER GLEICHEN FARBE DARGESTELLT UND GRUPPIERT IN DEN JEWEILIGEN ÄSTEN. BOOTSTRAPWERTE UNTER 85 SIND AUSGEBLENDET.....	37
ABBILDUNG 17 ERMITTELTE SEQUENZSTRUKTUR DER HÄMOCYANIN-ISOFORM 2 VON C. SQUAMIFERUM UND G. AEGIS MIT DER TRIPLIKATION DER FU-C ZWISCHEN FU-A UND FU-B.....	37
ABBILDUNG 18 ALIGNMENT DER BEIDEN ABGELEITETEN HÄMOCYANIN-PROTEINSEQUENZEN CSH 1 UND CSH 2 UNTERTEILT IN DIE EINZELNEN FUS MIT DEM FARBSCHHEMA BLOSUM62 (MIT EINEM THRESHOLD VON 1), HOCHKONSERVIERTE AMINOSÄUREN SIND DUNKELGRÜN HINTERLEGT (100%), EINE ÄHNLICHKEIT DER AMINOSÄUREN ZWISCHEN 80 UND 100 % MIT HELLGRÜN HINTERLEGT UND EINE ÄHNLICHKEIT VON 60 % BIS 80 % DER AMINOSÄUREN MIT GELB HINTERLEGT WURDE. BEI EINER ÄHNLICHKEIT VON WENIGER ALS 60 % DER AMINOSÄUREN WURDE KEINE FARBE HINTERLEGT.	39
ABBILDUNG 19 ALS QUERY SEQUENZ WURDE H. RUBRA H1 MIT MEGABLAST GEGEN DAS GENOM VON H. LAEVIGATA „GEMAPPT“, DIE ALIGNIERTEN SEQUENZBEREICH DER EXONS SIND ROT DARGESTELLT, DIE SCHWARZEN BALKEN ENTSPRECHEN DEN INTRONS.....	43
ABBILDUNG 20 ALS QUERY SEQUENZ WURDE H. RUBRA H2 MIT MEGABLAST GEGEN DAS GENOM VON H. LAEVIGATA „GEMAPPT“, DIE ALIGNIERTEN SEQUENZBEREICH DER EXONS SIND ROT DARGESTELLT, DIE SCHWARZEN BALKEN ENTSPRECHEN DEN INTRONS.....	44
ABBILDUNG 21 DIE EINZELNEN FUS VON KLH 1, R. VENOSA H2, C. ARPSEUM ALPHAN, S. OFFICINALIS H1 UND L. HYALINA WURDEN ALS UNGEWURZELTER BAUM ((PHYML, LG+G, BOOTSTRAP 100), FU-A IST IN PINK, FU-B IN HELLBLAU, FU-C IN ROT, FU-D IN GRÜN, FU-E IN DUNKELBLAU, FU-F IN GELB, FU-G IN SCHWARZ UND FU-H IN ORANGE) DARGESTELLT. DIE FUS VON L. HYALINA WURDEN ENTSPRECHEND DER POSITION IN DER HÄMOCYANIN-SEQUENZ MIT FU 1 BIS FU 8 BENANNT.	45
ABBILDUNG 22 DARSTELLUNG DER ASSEMBLIERUNGSERGEBNISSE FÜR POLYPLACOPHORA, VOLLAUSGEFÜLLTE KÄSTCHEN DER ARTEN ENTSPRECHEN VOLLSTÄNDIG ASSEMBLIERTEN HÄMOCYANIN-SEQUENZEN, TEILAUSSGEFÜLLTE KÄSTCHEN DER ARTEN ENTSPRECHEN TEIL-ASSEMBLIERTEN HÄMOCYANIN-SEQUENZEN DER NEOLORICATA, WEIßES KÄSTCHEN REPRÄSENTIERT KEINE ASSEMBLIERUNGEN FÜR CALLOCHITONIDA.....	46
ABBILDUNG 23 ÜBERSICHT DER GENSTRUKTUR DER HÄMOCYANINE (EXON-INTRON) DER MOLLUSKEN, LEPETELLIDA, PELTOSPIRIDAE, CHITONIDA, OCTOPODOIDEA UND NAUTILUS HÄMOCYANIN STRUKTUR MIT INTERNEN UND LINKER INTRONS. DIE GROßEN RECHTECKE STELLEN DIE FUNKTIONELLEN EINHEITEN GEMÄß DEM BEKANNTEN FARBSCHHEMA, FU A BIS FU G BZW. FU H DAR. LINKER INTRONS (PHASE 1) SIND MIT GELBEN PFEILEN MARKIERT, INTERNE INTRONS JE NACH PHASE WEIß (PHASE 0), GRAU (PHASE 1) UND SCHWARZ (PHASE 2). ADAPTIERT NACH (SCHÄFER ET AL. 2021B).....	47
ABBILDUNG 24: EVOLUTIONSANALYSE MIT DER MAXIMUM-LIKELIHOOD-METHODE IN MEGAX: DIE EVOLUTIONSGESCHICHTE WURDE MIT HILFE DER MAXIMUM-LIKELIHOOD-METHODE UND DEM MODELL VON WHELAN UND GOLDMAN + FREQ. ABGELEITET [1]. DARGESTELLT IST DER BAUM MIT DER HÖCHSTEN LOGARITHMISCHEN WAHRSCHEINLICHKEIT (-116434,87). DER PROZENTUALE ANTEIL DER BÄUME, IN DENEN DIE ZUGEHÖRIGEN TAXA GECLUSTERT SIND, IST NEBEN DEN ZWEIGEN ANGEZEIGT. DIE AUSGANGSBÄUME FÜR DIE HEURISTISCHE SUCHE WURDEN AUTOMATISCH ERMITTELT, INDEM DIE ALGORITHMEN NEIGHBOR-JOIN UND BIONJ AUF EINE MATRIX PAARWEISER ABSTÄNDE ANGEWANDT WURDEN, DIE MIT DEM JTT-MODELL GESCHÄTZT WURDEN, UND DANN DIE TOPOLOGIE MIT DEM HÖCHSTEN LOG-LIKELIHOOD-WERT AUSGEWÄHLT WURDE. EINE DISKRETE GAMMA-VERTEILUNG WURDE VERWENDET, UM UNTERSCHIEDE IN DER EVOLUTIONSRATE ZWISCHEN DEN STANDORTEN ZU MODELLIEREN (5 KATEGORIEN (+G, PARAMETER = 1,5664)). DAS MODELL DER RATENVARIATION ERMÖGLICHTE ES, DASS EINIGE STANDORTE EVOLUTIONÄR UNVERÄNDERLICH SIND ([+I], 4,21 % DER STANDORTE). DER BAUM IST MAßSTABSGETREU GEZEICHNET, WOBEI DIE ZWEIGLÄNGEN IN DER ANZAHL DER SUBSTITUTIONEN PRO STANDORT GEMESSEN WERDEN. DER ANTEIL DER STELLEN, AN DENEN MINDESTENS EINE EINDEUTIGE	

BASE IN MINDESTENS EINER SEQUENZ FÜR JEDE ABSTEIGENDE KLADE VORHANDEN IST, WIRD NEBEN JEDEM INTERNEN KNOTEN IM BAUM ANGEZEIGT. DIESE ANALYSE UMFASSTE 46 AMINOSÄURESEQUENZEN. DIE KODIERENDEN DATEN WURDEN UNTER DER ANNAHME EINER N/A GENETISCHEN CODETABELLE ÜBERSETZT. DER ENDGÜLTIGE DATENSATZ ENTHIELT INSGESAMT 2484 POSITIONEN. DIE EVOLUTIONÄREN ANALYSEN WURDEN IN MEGA X [2] DURCHFÜHRT.1. WHELAN UND GOLDMAN (2001), KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, AND TAMURA K (2018), FELSENSTEIN (1985) 50

ABBILDUNG 25 AMIOOSÄUREN ALIGNMENT DER FERRITIN-SEQUENZEN BLOSUM 62 FARBSHEMA GRÜN ENTSPRICHT 100 IDENTITÄT IN ALLEN 56

ABBILDUNG 26 3D DARSTELLUNG VON LILOPHURA JAPONICA FERRITIN-MONOMER AUS UNIProt O15972 · O15972_LIOJA (UNIProt: THE UNIVERSAL PROTEIN KNOWLEDGEBASE IN 2023 2023; JUMPER ET AL. 2021; VARADI ET AL. 2022) ... 57

ABBILDUNG 27 BÄNDERMODELL EINES FERRITIN-MONOMERS VON CRASSOSTREA GIGAS (UNIProt ACCESSION-NUMMER: Q2PDG9) UNTER ANGABE DES KONFIDENZ-NIVEAUS DER MODELLIERUNG MIT ALPHA FOLD 57

ABBILDUNG 28 PHYLOGRAMM DER MOLLUSKEN-FERRITINE MIT GEZEIGTEN BOOTSTRAP-WERTEN AB 50 (LETUNIC UND BORK 2024) 59

ABBILDUNG 29 GENOMGRÖÖE DER PELTOSPIRIDAE NACH NCBI GENOME GRAFIK NACH ZHANG ET AL. (2024) 60

ABBILDUNG 30 PHYLOGENIE EINIGER HALIOTIDAE NACH (TSHILATE ET AL. 2023) MIT DER ANGABE DER ANZAHL DER FERRITIN-SEQUENZEN DURCH FARBSHEMA **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

Supplements

Assemblierte Sequenzen Hämocyanine und Ferritine im Fasta-Format, Distanzmatrix Alignments Hämocyanine, Hämocyanine Gastropoden, Ferritine

\Nucleotide alignment Lepetellida.fasta"
 \Nucleotide alignment Mollusca Caenogastropoda Fu b bis g MUSCLE .fasta"
 \Nucleotide alignment Mollusca Caenogastropoda MUSCLE ohne RvH 2 NIH 2.fasta"
 \Nucleotide alignment Molluska Gastropoda ohne GaH1.fasta"
 \Nucleotide alignment Neoloricata.fasta"
 \Nucleotide alignment Neomphaliones.fasta"
 \Nucleotide alignment Trochida.fasta"
 \Nucleotide alignment Vetigastropoda.fasta"
 \Statistik Ferritin Analyse alignments Identity und Länge gesamt.xlsx"
 \UWCZCVEW016-Alignment Acanthopleura granulata genom hämocyanin sequenz mit transkriptom blast ncbi.txt"
 \UWCZCVEW016-Alignment Acanthopleura granulata hämocyanin sequenz mit transkriptom blast ncbi gegen Genom Liolophura japonica bearbeitet.txt"
 \Assemblierte Sequenzdaten Ferritin"
 \Assemblierte Sequenzdaten Hämocyanin"
 \AS Alignment 32 S Gastropoda ClustalW Geneious®.csv"
 \AS Alignment 46 S Mollusca ClustalW Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 2 S Neomphaliones Muscle Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 2 S Solenogastres Muscle Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 3 S Scaphopoda Muscle Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 4 S Coleoidea Muscle Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 4 S Heterobranchia Muscle Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 6 S Caudofoveata Muscle Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 7 S Caenogastropoda Muscle Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 13 S Neoloricata Muscle Geneious®.csv"

\Ferritin Alignment 13 S Neoloricata ohne L. japonica Muscle Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 18 S Autobranchia Muscle Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 37 S Vetigastropoda Muscle Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 50 S Gastropoda Muscle Geneious®.csv"
 \Ferritin Alignment 98 S Mollusca Muscle Geneious®.csv"
 \Nucleotide alignment alle Mollusca ohne GaH1 ohne outgroup translation alignment.fasta"
 \Nucleotide alignment Caenogastropoda.fasta"
 \Nucleotide alignment Coleoidea.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin 98 S MUSCLE Default Geneious® 90 identity.fa"
 \Nucleotide alignment Ferritin Autobranchia 18 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Caenogastropoda 7 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Caudofoveata 6 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Chitonida 10 S ohne Liolo MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Chitonida 11 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Coleoidea 3 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin gastropoda 50 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Heterobranchia 4 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Lepetellida 14 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Lepidopleurida 2 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Neoloricata 12 S ohne Liolophara MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Neoloricata 13 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Neomphaliones 2 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Scaphopoda 3 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Solenogastres 2 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Trochida 22 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Ferritin Vetigastropoda 37 S MUSCLE Default Geneious®.fasta"
 \Nucleotide alignment Gastropoden translation alignment 2.fasta"
 \Nucleotide alignment Heterobranchia.fasta"

Literaturverzeichnis

- Ab Lah, Roslizawati; Smith, Joshua; Savins, D.; Dowell, A.; Bucher, D.; Benkendorff, K. (2017): Investigation of nutritional properties of three species of marine turban snails for human consumption. In: *Food science & nutrition* 5 (1), S. 14–30. DOI: 10.1002/fsn3.360.
- Adameyko, Kim I.; Burakov, Anton V.; Finoshin, A. D.; Mikhailov, K. V.; Kravchuk, O. I.; Kozlova, O. S. et al. (2021): Conservative and Atypical Ferritins of Sponges. In: *International journal of molecular sciences* 22 (16). DOI: 10.3390/ijms22168635.
- Adema, Coen. M.; Hillier, LaDeana W.; Jones, C. S.; Loker, E. S.; Knight, M.; Minx, P. et al. (2017): Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. In: *Nature communications* 8, S. 15451. DOI: 10.1038/ncomms15451.
- Aguilera, Felipe; McDougall, Carmel; Degnan, B. M. (2013): Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. In: *BMC evolutionary biology* 13, S. 96. DOI: 10.1186/1471-2148-13-96.
- Aktipis, Stephanie W.; Giribet, Gonzalo (2012): Testing relationships among the vetigastropod taxa: a molecular approach. // Testing relationships among the vetigastropod taxa: a molecular approach. In: *Journal of Molluscan Studies* 78 (78 // 1), S. 12–27. DOI: 10.1093/mollus/eyr023.
- Aktipis, Stephanie W.; Giribet, Gonzalo; Lindberg, D. R.; PONDER, W. F. (2008): Gastropoda. In: Winston Ponder (Hg.): *Phylogeny and evolution of the mollusca*. Unter Mitarbeit von WINSTON F. PONDER und David R. Lindberg. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press, S. 200–237.
- Aktipis, Stephanie. W.; Giribet, Gonzalo (2010): A phylogeny of Vetigastropoda and other “archaeogastropods”: re-organizing old gastropod clades. In: *Invertebrate Biology* 129 (3), S. 220–240. DOI: 10.1111/j.1744-7410.2010.00198.x.
- Albrecht, Ute.; Keller, Henning.; Gebauer, Wolfgang; Markl, Jürgen (2001): Rhogocytes (pore cells) as the site of hemocyanin biosynthesis in the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. In: *Cell and tissue research* 304 (3), S. 455–462. DOI: 10.1007/s004410100368.
- Alnashiri, Hassien; Thomas, Liju; Philip, S.; Thakkottathil, M.; Sureshkumar, S.; Kutty, R. (2023): Complete Mitochondrial Genome and Phylogenetic Relationships of the Red Sea Chiton *Acanthopleura vaillantii* Rochebrune, 1882 (Polyplacophora: Chitonida). In: *Thalassas*. DOI: 10.1007/s41208-023-00648-0.
- Altenhein, Benjamin; Markl, Jürgen; Lieb, Bernhard (2002): Gene structure and hemocyanin isoform HtH2 from the mollusc *Haliotis tuberculata* indicate early and late intron hot spots. In: *Gene* 301 (1-2), S. 53–60. DOI: 10.1016/s0378-1119(02)01081-8.
- Altschul, Stephen F.; Gish, Warren; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. In: *Journal of molecular biology* 215 (3), S. 403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Alvarez, Mariano; Schrey, Aaron W.; Richards, Christina L. (2015): Ten years of transcriptomics in wild populations: what have we learned about their ecology and evolution? In: *Molecular ecology* 24 (4), S. 710–725. DOI: 10.1111/mec.13055.
- Amorim, João; Abreu, Isabel; Rodrigues, Pedro; Peixoto, Diogo; Pinheiro, Carlos; Saraiva, Aurélia et al. (2019): *Lymnaea stagnalis* as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies. In: *The Science of the total environment* 669, S. 11–28. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.035.

- Andersen, J.; Halvorsen, O. (1984): Species composition, abundance, habitat requirements and regional distribution of terrestrial gastropods in Arctic Norway. In: *Polar Biology* 3, S. 45–53.
- Andrews, Simon C. (2010): The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. In: *Biochimica et biophysica acta* 1800 (8), S. 691–705. DOI: 10.1016/j.bbagen.2010.05.010.
- Andrews, Simon C.; Arosio, P.; Bottke, W.; Briat, J. F.; Darl, M. von; Harrison, P. M. et al. (1992): Structure, function, and evolution of ferritins. In: *Journal of inorganic biochemistry* 47 (3-4), S. 161–174. DOI: 10.1016/0162-0134(92)84062-R.
- Appeltans, Ward; Ahyong, Shane T.; Anderson, Gary; Angel, Martin V.; Artois, Tom; Bailly, Nicolas et al. (2012): The magnitude of global marine species diversity. In: *Current biology : CB* 22 (23), S. 2189–2202. DOI: 10.1016/j.cub.2012.09.036.
- Arancibia, Sergio; Espinoza, Cecilia; Salazar, Fabián; Del Campo, Miguel; Tampe, Ricardo; Zhong, Ta-Ying et al. (2014): A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet *Fissurella latimarginata* promotes potent anti-tumor activity in melanoma. In: *PLoS one* 9 (1), e87240. DOI: 10.1371/journal.pone.0087240.
- Ayyagari, Vijaya Sai; Sreerama, Krupanidhi (2020): Molecular phylogeny and evolution of Pulmonata (Mollusca: Gastropoda) on the basis of mitochondrial (16S, COI) and nuclear markers (18S, 28S): an overview. In: *J Genet* 99 (1). DOI: 10.1007/s12041-020-1177-z.
- Bao, Yongbo; Zeng, Qifan; Wang, Jing; Zhang, Zelei; Zhang, Yang; Wang, Sufang et al. (2021): Genomic Insights into the Origin and Evolution of Molluscan Red-Bloodedness in the Blood Clam *Tegillarca granosa*. In: *Molecular Biology and Evolution* 38 (6), S. 2351–2365. DOI: 10.1093/molbev/msab030.
- Barker, Gary M. (2001): *The biology of terrestrial molluscs*: CABI publishing.
- Barord, Gregory J.; Combosch, David J.; Giribet, Gonzalo; Landman, Neil; Lemer, Sarah; Veloso, Job; Ward, Peter D. (2023): Three new species of *Nautilus* Linnaeus, 1758 (Mollusca, Cephalopoda) from the Coral Sea and South Pacific. In: *ZK* 1143, S. 51–69. DOI: 10.3897/zookeys.1143.84427.
- Bartsch, Paul (1922): *A monograph of the American shipworms*: US Government Printing Office (122).
- Beil, Andrea; Jurt, Simon; Walser, Reto; Schönhut, Tanja; Güntert, Peter; Palacios, Óscar et al. (2019): The Solution Structure and Dynamics of Cd-Metallothionein from *Helix pomatia* Reveal Optimization for Binding Cd over Zn. In: *Biochemistry* 58 (45), S. 4570–4581. DOI: 10.1021/acs.biochem.9b00830.
- Benkendorff, Kirsten (2010): Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs. In: *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 85 (4), S. 757–775. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2010.00124.x.
- Bergmann, Sandra; Lieb, Bernhard; Ruth, Peter; Markl, Jürgen (2006): The hemocyanin from a living fossil, the cephalopod *Nautilus pompilius*: protein structure, gene organization, and evolution. In: *Journal of molecular evolution* 62 (3), S. 362–374. DOI: 10.1007/s00239-005-0160-x.
- Bergmann, Sandra; Markl, Jürgen; Lieb, Bernhard (2007): The first complete cDNA sequence of the hemocyanin from a bivalve, the protobranch *Nucula nucleus*. In: *Journal of molecular evolution* 64 (5), S. 500–510. DOI: 10.1007/s00239-006-0036-8.

- Bonafe, C. F.; Araujo, J. R.; Silva, J. L. (1994): Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure. In: *Biochemistry* 33 (9), S. 2651–2660. DOI: 10.1021/bi00175a038.
- Bonaventura, C.; Bonaventura, J.; Miller, K. I.; van Holde, K. E. (1981): Hemocyanin of the chambered nautilus: structure-function relationships. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 211 (2), S. 589–598. DOI: 10.1016/0003-9861(81)90493-8.
- Bottke, W. (1982): Isolation and properties of vitellogenic ferritin from snails. In: *Journal of Cell Science* 58, S. 225–240. DOI: 10.1242/jcs.58.1.225.
- Bouchet, Philippe; Rocroi, Jean-Pierre (2005): Classification and nomenclator of gastropod families. Hackenheim: ConchBooks (Malacologia, 47.2005).
- Bouchet, Philippe; Rocroi, Jean-Pierre; Hausdorf, Bernhard; Kaim, Andrzej; Kano, Yasunori; Nützel, Alexander et al. (2017): Revised Classification, Nomenclator and Typification of Gastropod and Monoplacophoran Families. In: *Malacologia* 61 (1-2), S. 1–526. DOI: 10.4002/040.061.0201.
- Bourlat, Sarah J.; Nielsen, Claus; Lockyer, Anne E.; Littlewood, D. Timothy J.; Telford, Maximilian J. (2003): Xenoturbella is a deuterostome that eats molluscs. In: *Nature* 424 (6951), S. 925–928. DOI: 10.1038/nature01851.
- Boutet, Isabelle; Ripp, Raymond; Lecompte, Odile; Dossat, Carole; Corre, Erwan; Tanguy, Arnaud; Lallier, François H. (2011): Conjugating effects of symbionts and environmental factors on gene expression in deep-sea hydrothermal vent mussels. In: *BMC Genomics* 12 (1), S. 530. DOI: 10.1186/1471-2164-12-530.
- Breusing, Corinna; Klobusnik, Nathan Hagen; Hauer, Michelle A.; Beinart, Roxanne A. (2022): Genome assembly of the chemosynthetic endosymbiont of the hydrothermal vent snail *Alviniconcha adamantis* from the Mariana Arc. In: *G3 (Bethesda, Md.)* 12 (10). DOI: 10.1093/g3journal/jkac220.
- Brix, O.; Bårdgard, A.; Cau, A.; Colosimo, A.; Condò, S. G.; Giardina, B. (1989): Oxygen-binding properties of cephalopod blood with special reference to environmental temperatures and ecological distribution. In: *J. Exp. Zool.* 252 (1), S. 34–42. DOI: 10.1002/jez.1402520106.
- Brooker, L.; Lee, A.; Macey, D.; van Bronswijk, W.; Webb, J. (2003): Multiple-front iron-mineralisation in chiton teeth (*Acanthopleura echinata*: Mollusca: Polyplacophora). In: *Marine Biology* 142 (3), S. 447–454. DOI: 10.1007/s00227-002-0957-8.
- Burmester, T. (2001): Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. In: *Molecular Biology and Evolution* 18 (2), S. 184–195. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003792.
- Burnett, Louis E., Scholnick, David A., Mangum, Charlotte P. (1988): Temperature Sensitivity of Molluscan and Arthropod Hemocyanins. In: *The Biological Bulletin* 174 (2), S. 153–162. DOI: 10.2307/1541782.
- Calatayud, Sara; Garcia-Risco, Mario; Pedrini-Martha, Veronika; Eernisse, Douglas J.; Dallinger, Reinhard; Palacios, Òscar et al. (2021): Modularity in Protein Evolution: Modular Organization and De Novo Domain Evolution in Mollusk Metallothioneins. In: *Molecular Biology and Evolution* 38 (2), S. 424–436. DOI: 10.1093/molbev/msaa230.
- Chang, Xiaoxi; Lv, Chenyan; Zhao, Guanghua (2023): A Dual Function of Ferritin (Animal and Plant): Its Holo Form for Iron Supplementation and Apo Form for Delivery Systems. In: *Annual*

review of food science and technology 14, S. 113–133. DOI: 10.1146/annurev-food-060721-024902.

Chasteen, N. D.; Harrison, P. M. (1999): Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. In: *Journal of structural biology* 126 (3), S. 182–194. DOI: 10.1006/jsbi.1999.4118.

Chen, Chong; Copley, Jonathan T.; Linse, Katrin; Rogers, Alex D.; Sigwart, Julia (2015a): How the mollusc got its scales: convergent evolution of the molluscan scleritome. In: *Biol J Linn Soc Lond* 114 (4), S. 949–954. DOI: 10.1111/bij.12462.

Chen, Chong; Copley, Jonathan T.; Linse, Katrin; Rogers, Alex D.; Sigwart, Julia D. (2015b): The heart of a dragon: 3D anatomical reconstruction of the 'scaly-foot gastropod' (Mollusca: Gastropoda: Neomphalina) reveals its extraordinary circulatory system. In: *Frontiers in zoology* 12, S. 13. DOI: 10.1186/s12983-015-0105-1.

Chen, Chong; Linse, Katrin; Copley, Jonathan T.; Rogers, Alex D. (2015c): The 'scaly-foot gastropod': a new genus and species of hydrothermal vent-endemic gastropod (Neomphalina: Peltospiridae) from the Indian Ocean. In: *J. Mollus. Stud.* 81 (3), S. 322–334. DOI: 10.1093/mollus/eyv013.

Chen, Chong; Linse, Katrin; Roterman, Christopher N.; Copley, Jonathan T.; Rogers, Alex D. (2015d): A new genus of large hydrothermal vent-endemic gastropod (Neomphalina: Peltospiridae). In: *Zool J Linn Soc* 175 (2), S. 319–335. DOI: 10.1111/zoj.12279.

Chen, Chong; Uematsu, Katsuyuki; Linse, Katrin; Sigwart, Julia D. (2017a): By more ways than one: Rapid convergence at hydrothermal vents shown by 3D anatomical reconstruction of *Gigantopelta* (Mollusca: Neomphalina). In: *BMC evolutionary biology* 17 (1), S. 62. DOI: 10.1186/s12862-017-0917-z.

Chen, Chong; Zhou, Yadong; Wang, Chunsheng; Copley, Jonathan T. (2017b): Two New Hot-Vent Peltospirid Snails (Gastropoda: Neomphalina) from Longqi Hydrothermal Field, Southwest Indian Ridge. In: *Front. Mar. Sci.* 4, Artikel 392. DOI: 10.3389/fmars.2017.00392.

Chiumiento, Ignacio Rafael; Ituarte, Santiago; Sun, Jin; Qiu, Jian Wen; Heras, Horacio; Dreon, Marcos Sebastián (2020): Hemocyanin of the caenogastropod *Pomacea canaliculata* exhibits evolutionary differences among gastropod clades. In: *PloS one* 15 (1), e0228325. DOI: 10.1371/journal.pone.0228325.

Clark, R. B. (1963): The economics of *Dentalium*. In: *The Veliger* 6, S. 9–19.

Cloney, Richard A.; BROCCO, STEVEN L. (1983): Chromatophore Organs, Reflector Cells, Iridocytes and Leucophores in Cephalopods. In: *Am Zool* 23 (3), S. 581–592. DOI: 10.1093/icb/23.3.581.

Coates, Christopher J.; Costa-Paiva, Elisa M. (2020): Multifunctional Roles of Hemocyanins. In: *Sub-cellular biochemistry* 94, S. 233–250. DOI: 10.1007/978-3-030-41769-7_9.

Coates, Christopher J.; Nairn, Jacqueline (2014): Diverse immune functions of hemocyanins. In: *Developmental & Comparative Immunology* 45 (1), S. 43–55.

Cock, Peter J. A.; Fields, Christopher J.; Goto, Naohisa; Heuer, Michael L.; Rice, Peter M. (2010): The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. In: *Nucleic acids research* 38 (6), S. 1767–1771. DOI: 10.1093/nar/gkp1137.

Copley, J. T.; Marsh, L.; Glover, A. G.; Hühnerbach, V.; Nye, V. E.; Reid, W. D. K. et al. (2016): Ecology and biogeography of megafauna and macrofauna at the first known deep-sea

- hydrothermal vents on the ultraslow-spreading Southwest Indian Ridge. In: *Scientific reports* 6, S. 39158. DOI: 10.1038/srep39158.
- Costa-Paiva, Elisa M.; Schrago, Carlos G.; Halanych, Kenneth M. (2017): Broad Phylogenetic Occurrence of the Oxygen-Binding Hemerythrins in Bilaterians. In: *Genome biology and evolution* 9 (10), S. 2580–2591. DOI: 10.1093/gbe/evx181.
- Crichton, Robert R.; Declercq, Jean-Paul (2010): X-ray structures of ferritins and related proteins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1800 (8), S. 706–718. DOI: 10.1016/j.bbagen.2010.03.019.
- Cunha, Tauana Junqueira; Giribet, Gonzalo (2019a): A congruent topology for deep gastropod relationships. In: *Proceedings. Biological sciences* 286 (1898), S. 20182776. DOI: 10.1098/rspb.2018.2776.
- Cunha, Tauana Junqueira; Giribet, Gonzalo (2019b): A phylogenomic framework for Vetigastropoda (Mollusca) (25).
- Dang, Vinh T.; Benkendorff, Kirsten; Green, Tim; Speck, Peter (2015): Marine Snails and Slugs: a Great Place To Look for Antiviral Drugs. In: *Journal of virology* 89 (16), S. 8114–8118. DOI: 10.1128/JVI.00287-15.
- Darl, M. von; Harrison, P. M.; Bottke, W. (1994): cDNA cloning and deduced amino acid sequence of two ferritins: soma ferritin and yolk ferritin, from the snail *Lymnaea stagnalis* L. In: *European journal of biochemistry* 222 (2), S. 353–366. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18874.x.
- Deaton, Lewis E.; Derby, Jennifer G.S.; Subhedar, Nishikant; Greenberg, Michael J. (1989): Osmoregulation and salinity tolerance in two species of bivalve mollusc: *Limnoperna fortunei* and *Mytilopsis leucophaeta*. In: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 133 (1-2), S. 67–79. DOI: 10.1016/0022-0981(89)90158-5.
- DeBiasse, Melissa B.; Kelly, Morgan W. (2016): Plastic and Evolved Responses to Global Change: What Can We Learn from Comparative Transcriptomics? In: *J Hered* 107 (1), S. 71–81. DOI: 10.1093/jhered/esv073.
- Decker, C.; Zorn, N.; Potier, N.; Leize-Wagner, E.; Lallier, F. H.; Olu, K.; Andersen, A. C. (2014): Globin's structure and function in vesicomid bivalves from the Gulf of Guinea cold seeps as an adaptation to life in reduced sediments. In: *Physiological and biochemical zoology : PBZ* 87 (6), S. 855–869. DOI: 10.1086/678131.
- Decker, H.; Terwilliger, N. (2000): Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. In: *The Journal of Experimental Biology* 203 (Pt 12), S. 1777–1782. DOI: 10.1242/jeb.203.12.1777.
- Decker, Heinz; Hellmann, Nadja; Jaenicke, Elmar; Lieb, Bernhard; Meissner, Ulrich; Markl, Jürgen (2007): Minireview: Recent progress in hemocyanin research. In: *Integrative and comparative biology* 47 (4), S. 631–644. DOI: 10.1093/icb/icm063.
- Declair, W.; Lemaire, J.; Richard, A.: The Differentiation of Blood Proteins During Ontogeny in *Sepia officinalis* L. In: *Comp. Biochem. Physiol* 1971 (Vol. 40B), pp. 923 to 930.
- Del Amparo, Roberto; Arenas, Miguel (2023): Influence of substitution model selection on protein phylogenetic tree reconstruction. In: *Gene* 865, S. 147336.
- Deng, Tuo; Gao, Dongxiu; Song, Xuemei; Zhou, Zhipeng; Zhou, Lixiao; Tao, Maixian et al. (2023): A natural biological adhesive from snail mucus for wound repair. In: *Nature communications* 14 (1), S. 396. DOI: 10.1038/s41467-023-35907-4.

- Dickey, Lynn F.; Sreedharan, S.; Theil, E. C.; Didsbury, J. R.; Wang, Y. H.; Kaufman, R. E. (1987): Differences in the regulation of messenger RNA for housekeeping and specialized-cell ferritin. A comparison of three distinct ferritin complementary DNAs, the corresponding subunits, and identification of the first processed in amphibia. In: *Journal of Biological Chemistry* 262 (16), S. 7901–7907.
- Doeller, Jeannette E.; Kraus, David W.; Colacino, James M.; Wittenberg, Jonathan B. (1988): Gill hemoglobin may deliver sulfide to bacterial symbionts of *Solemya velum* (Bivalvia, Mollusca). In: *The Biological Bulletin* 175 (3), S. 388–396.
- Dolashka-Angelova, Pavlina; Lieb, Bernhard; Velkova, Ludmila; Heilen, Nina; Sandra, Koen; Nikolaeva-Glomb, Lubomira et al. (2009): Identification of glycosylated sites in *Rapana* hemocyanin by mass spectrometry and gene sequence, and their antiviral effect. In: *Bioconjugate chemistry* 20 (7), S. 1315–1322.
- Dolashki, Aleksandar; Velkova, Lyudmila; Voelter, Wolfgang; Dolashka, Pavlina (2019): Structural and conformational stability of hemocyanin from the garden snail *Cornu aspersum*. In: *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* 74 (5-6), S. 113–123. DOI: 10.1515/znc-2018-0084.
- Duda, Thomas F.; Kohn, Alan J. (2005): Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus*. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 34 (2), S. 257–272. DOI: 10.1016/j.ympev.2004.09.012.
- Dunn, Casey W.; Hejnol, Andreas; Matus, David Q.; Pang, Kevin; Browne, William E.; Smith, Stephen A. et al. (2008): Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. In: *Nature* 452 (7188), S. 745–749. DOI: 10.1038/nature06614.
- Edgar, Robert C. (2004): MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. In: *BMC bioinformatics* 5, S. 113. DOI: 10.1186/1471-2105-5-113.
- Eernisse, D. J.; Reynolds, P. D. (1994): Polyplacophora. 55–110. In: *Microscopic anatomy of invertebrates* 5.
- Erlanson, Jon M.; Vellanoweth, Ren L.; Rick, Torben C.; Reid, Melissa R. (2005): Coastal foraging at Otter Cave: A 6600-year-old shell midden on San Miguel Island, California. In: *Journal of California and Great Basin Anthropology*, S. 69–86.
- Evans, Tyler G.; Hofmann, Gretchen E. (2012): Defining the limits of physiological plasticity: how gene expression can assess and predict the consequences of ocean change. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 367 (1596), S. 1733–1745. DOI: 10.1098/rstb.2012.0019.
- Felsenstein, Joseph (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. In: *evolution* 39 (4), S. 783–791.
- Fioroni, P, Schmekel, L (1976): Die nährstoffreiche Gastropoden-Ontogenese. Online verfügbar unter <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getrecorddetail&idt=pascal7750150877>.
- Fredericq L (1878): La Physiologie du poulpe commun (*Octopus vulgaris*). In: *Arch Zool Exp Gén* (7), S. 535–583.
- Frey, Perry A.; Reed, George H. (2012): The ubiquity of iron: ACS Publications.
- Gai, Zuoqi; Matsuno, Asuka; Kato, Koji; Kato, Sanae; Khan, Md Rafiqul Islam; Shimizu, Takeshi et al. (2015): Crystal Structure of the 3.8-MDa Respiratory Supermolecule Hemocyanin at 3.0 Å

Resolution. In: *Structure (London, England : 1993)* 23 (12), S. 2204–2212. DOI: 10.1016/j.str.2015.09.008.

Gambacurta, A.; Piro, M. C.; Ascoli, F. (1993): Cooperative homodimeric hemoglobin from *Scapharca inaequivalvis*. cDNA cloning and expression of the fully functional protein in *E. coli*. In: *FEBS letters* 330 (1), S. 90–94. DOI: 10.1016/0014-5793(93)80926-I.

Gant, Timothy W.; Sauer, Ursula G.; Zhang, Shu-Dong; Chorley, Brian N.; Hackermüller, Jörg; Perdichizzi, Stefania et al. (2017): A generic Transcriptomics Reporting Framework (TRF) for 'omics data processing and analysis. In: *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 91 Suppl 1 (Suppl 1), S36-S45. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.11.001.

García-Álvarez, Oscar; Urgorri, Victoriano; Cristobo-Rodriguez, Francisco J. (2000): Synopsis of the interstitial Solenogastres (Mollusca) (14). Online verfügbar unter https://www.researchgate.net/profile/victoriano-urgorri/publication/250613419_synopsis_of_the_interstitial_solenogastres_mollusca.

García-Souto, Daniel; Martínez-Mariño, Víctor; Morán, Paloma; Olabarria, Celia; Vázquez, Elsa (2024): Hiding from heat: The transcriptomic response of two clam species is modulated by behaviour and habitat. In: *Journal of thermal biology* 119, S. 103776. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2023.103776.

Gatsogiannis, C.; Markl, J. (2013): Keyhole limpet hemocyanin (KLH): 9A cryoEM structure and molecular model of the KLH1 didecamer reveal the interfaces and intricate topology of the 160 functional units.

Gatsogiannis, Christos; Hofnagel, Oliver; Markl, Jürgen; Raunser, Stefan (2015): Structure of mega-hemocyanin reveals protein origami in snails. In: *Structure (London, England : 1993)* 23 (1), S. 93–103. DOI: 10.1016/j.str.2014.10.013.

Gatsogiannis, Christos; Moeller, Arne; Depoix, Frank; Meissner, Ulrich; Markl, Jürgen (2007): Nautilus pompilius hemocyanin: 9 A cryo-EM structure and molecular model reveal the subunit pathway and the interfaces between the 70 functional units. In: *Journal of molecular biology* 374 (2), S. 465–486. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.09.036.

Gebauer, W.; Harris, J. R.; Geisthardt, G.; Markl, J. (1999a): Keyhole limpet hemocyanin type 2 (KLH2): detection and immunolocalization of a labile functional unit h. In: *Journal of structural biology* 128 (3), S. 280–286. DOI: 10.1006/jsbi.1999.4198.

Gebauer, W.; Stoeva, S.; Voelter, W.; Dainese, E.; Salvato, B.; Beltramini, M.; Markl, J. (1999b): Hemocyanin subunit organization of the gastropod *Rapana thomasiana*. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 372 (1), S. 128–134. DOI: 10.1006/abbi.1999.1478.

Gesheva, V.; Krassimira, I.; Kerekov, N.; Nikolova, K.; Mihaylova, N.; Doumanova, L.; Tchorbanov, A. (2015): *Rapana Thomasiana* hemocyanin as adjuvant for conventional vaccines. In: *Advances in Bulgarian Science* (26), S. 162–165.

Gesheva, Vera; Idakieva, Krassimira; Kerekov, Nikola; Nikolova, Kalina; Mihaylova, Nikolina; Doumanova, Lyuba; Tchorbanov, Andrey (2011): Marine gastropod hemocyanins as adjuvants of non-conjugated bacterial and viral proteins. In: *Fish & shellfish immunology* 30 (1), S. 135–142. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.09.018.

Gielens, C.; Benoy, C.; Préaux, G.; Lontie, R. (1986): Presence of Only Seven Functional Units in the Polypeptide Chain of the Haemocyanin of the Cephalopod *Octopus Vulgaris*. In: Bernt Linzen (Hg.): *Invertebrate Oxygen Carriers*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 223–226.

Giorgi, Alessandra; Mignogna, Giuseppina; Bellapadrona, Giuliano; Gattoni, Maurizio; Chiaraluca, Roberta; Consalvi, Valerio et al. (2008): The unusual co-assembly of H- and M-chains in the ferritin molecule from the Antarctic teleosts *Trematomus bernacchii* and *Trematomus newnesi*. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 478 (1), S. 69–74. DOI: 10.1016/j.abb.2008.06.022.

Giribet, Gonzalo; Edgecombe, Gregory D. (2012): Reevaluating the arthropod tree of life. In: *Annual review of entomology* 57, S. 167–186. DOI: 10.1146/annurev-ento-120710-100659.

Giribet, Gonzalo; Okusu, Akiko; Lindgren, Annie R.; Huff, Stephanie W.; Schrödl, Michael; Nishiguchi, Michele K. (2006): Evidence for a clade composed of molluscs with serially repeated structures: monoplacophorans are related to chitons. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (20), S. 7723–7728. DOI: 10.1073/pnas.0602578103.

Goffredi, Shana K.; Warén, Anders; Orphan, Victoria J.; van Dover, Cindy L.; Vrijenhoek, Robert C. (2004): Novel forms of structural integration between microbes and a hydrothermal vent gastropod from the Indian Ocean. In: *Applied and environmental microbiology* 70 (5), S. 3082–3090. DOI: 10.1128/AEM.70.5.3082–3090.2004.

Gosling, E. M. (2015): Marine bivalve molluscs. Second edition. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: Wiley Blackwell.

Götze, Jens; Göbbels, Matthias (Hg.) (2017): Einführung in die Angewandte Mineralogie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Grande, Cristina; Templado, José; Zardoya, Rafael (2008): Evolution of gastropod mitochondrial genome arrangements. In: *BMC evolutionary biology* 8, S. 61. DOI: 10.1186/1471-2148-8-61.

Grinich, N. P.; Terwilliger, R. C. (1980): The quaternary structure of an unusual high-molecular-weight intracellular haemoglobin from the bivalve mollusc *Barbatia reeveana*. In: *Biochem J* 189 (1), S. 1–8. DOI: 10.1042/bj1890001.

Guindon, Stéphane; Dufayard, Jean-François; Lefort, Vincent; Anisimova, Maria; Hordijk, Wim; Gascuel, Olivier (2010): New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. In: *Systematic biology* 59 (3), S. 307–321. DOI: 10.1093/sysbio/syq010.

Guindon, Stéphane; Gascuel, Olivier (2003): A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. In: *Systematic biology* 52 (5), S. 696–704. DOI: 10.1080/10635150390235520.

Hammen, C. S. (1980): TOTAL METABOLISM OF BIVALVE MOLLUSCS DURING TRANSITION TO ANOXIA. In: *Animals and Environmental Fitness*: Elsevier, S. 61–62.

Han, Ze-Guang; Brindley, Paul J.; Wang, Sheng-Yue; Chen, Zhu (2009): Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. In: *Annual review of genomics and human genetics* 10, S. 211–240. DOI: 10.1146/annurev-genom-082908-150036.

Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna (2006). 2. compl. rev. ed. Linz: Oberösterreichisches Landesmuseum Biologiezentrum (Kataloge der Oberösterreichischen Landesmuseen, N.S. 43).

Händel, Marc (2015): Al Hamriya – Dynamik einer Muschelhaufenlandschaft in den Vereinigten Arabischen Emiraten. In: *archaeologia* 1, S. 77–96. DOI: 10.1553/archaeologia97-98s77.

- Hanlon, R. T. and Messenger, J. B. (1988): Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis* L.): the morphology and development of body patterns and their relation to behaviour. In: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 320 (1200), S. 437–487. DOI: 10.1098/rstb.1988.0087.
- Harris, J. Robin; Meissner, Ulrich; Gebauer, Wolfgang; Markl, Jürgen (2004): 3D reconstruction of the hemocyanin subunit dimer from the chiton *Acanthochiton fascicularis*. In: *Micron* 35 (1-2), S. 23–26. DOI: 10.1016/j.micron.2003.10.008.
- Harris, J. Robin; Gebauer, Wolfgang; Markl, Jürgen (1993): Immunoelectron Microscopy of Hemocyanin from the Keyhole Limpet (*Megathura crenulata*): A Parallel Subunit Model. In: *Journal of structural biology* 111 (2), S. 96–104. DOI: 10.1006/jsbi.1993.1040.
- Harrison, P. M.; Arosio, P. (1996): The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. In: *Biochimica et biophysica acta* 1275 (3), S. 161–203. DOI: 10.1016/0005-2728(96)00022-9.
- Hashimoto, Jun; Ohta, Suguru; Gamo, Toshitaka; Chiba, Hitoshi; Yamaguchi, Toshiyuki; Tsuchida, Shinji et al. (2001): First Hydrothermal Vent Communities from the Indian Ocean Discovered. In: *Zoological Science* 18 (5), S. 717–721. DOI: 10.2108/zsj.18.717.
- Haszprunar, G. (1988): ON THE ORIGIN AND EVOLUTION OF MAJOR GASTROPOD GROUPS, WITH SPECIAL REFERENCE TO THE STREPTONEURA. In: *J. Mollus. Stud.* 54 (4), S. 367–441. DOI: 10.1093/mollus/54.4.367.
- Haszprunar, G.; Kunze, Thomas; Brückner, Martin; Heß, Martin (2016): Towards a sound definition of Skeneidae (Mollusca, Vetigastropoda): 3D interactive anatomy of the type species, *Skenea serpuloides* (Montagu, 1808) and comments on related taxa. In: *Org Divers Evol* 16 (3), S. 577–595. DOI: 10.1007/s13127-015-0260-4.
- Haszprunar, Gerhard (2008): 5. MONOPLACOPHORA (TRYBLIDIA). In: David R. R. Lindberg, Winston Ponder und Ponder/Lindberg (Hg.): *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. Berkeley, CA: University of California Press, S. 97–104. Online verfügbar unter https://www.researchgate.net/profile/gerhard-haszprunar/publication/376706152_5_monoplacophora_tryblidia.
- He, Jian; Jiang, Jingzhe; Gu, Lu; Zhao, Manman; Wang, Ruixuan; Ye, Lingtong et al. (2016): Identification and involvement of ferritin in the response to pathogen challenge in the abalone, *Haliotis diversicolor*. In: *Developmental and comparative immunology* 60, S. 23–32. DOI: 10.1016/j.dci.2016.01.022.
- He, Xiaocui; Zhang, Yang; Wu, Xiangyun; Xiao, Shu; Yu, Ziniu (2011): Cloning and characterization of two ferritin subunit genes from bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck 1819). In: *Molecular biology reports* 38 (3), S. 2125–2132. DOI: 10.1007/s11033-010-0339-0.
- Healy, John (2021): A new species of *Amoria* (Gastropoda, Volutidae, Amoriinae) from the mid-east coast of Australia. In: *mqmn* 62, S. 1–10. DOI: 10.17082/j.2204-1478.62.2020.2019-02.
- Hennig, W. (1980): *Wirbellose I: Ausgenommen Gliedertiere*. 5th ed. Jena: Gustav Fischer.
- Herskovits, T. T.; Hamilton, M. G. (1987): Physical investigations of the hemocyanin of the chiton, *Cryptochiton stelleri* (Middendorff). In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 86 (4), S. 641–649. DOI: 10.1016/0305-0491(87)90203-3.
- Herskovits, T. T.; Hamilton, M. G.; Cousins, C. J.; Wall, J. S. (1990): Light-scattering and scanning transmission electron microscopic investigation of the hemocyanin of the bivalve, *Yoldia limatula*

- (Say). In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 96 (3), S. 497–503. DOI: 10.1016/0305-0491(90)90047-w.
- Herskovits, T. T.; Hamilton, M. G.; Mazzella, L. J. (1986): Hemocyanin of the chiton *Acanthopleura granulata*. In: *Biochemistry* 25 (12), S. 3612–3619. DOI: 10.1021/bi00360a020.
- Hess, M.; Beck, F.; Gensler, H.; KANO, Y.; Kiel, S.; Haszprunar, G. (2008): Microanatomy, shell structure and molecular phylogeny of *Leptogyra*, *Xyleptogyra* and *Leptogyropsis* (Gastropoda: Neomphalida: Melanodrymiidae) from sunken wood. In: *J. Mollus. Stud.* 74 (4), S. 383–401. DOI: 10.1093/mollus/eyn030.
- Hickman, Carole S. (2013): Crosseolidae, a New Family of Skeneiform Microgastropods and Progress Toward Definition of Monophyletic Skeneidae. In: *American Malacological Bulletin* 31 (1), S. 1–16. DOI: 10.4003/006.031.0101.
- Hoffmann, K. H. (1983): Metabolic and Enzyme Adaptation to Temperature and Pressure. In: *The Mollusca*: Elsevier, S. 219–255.
- Hundahl, Christian; Fago, Angela; Weber, Roy E. (2003): Effects of water activity on oxygen-binding in high-molecular weight, extracellular invertebrate hemoglobin and hemocyanin. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 136 (1), S. 83–90. DOI: 10.1016/S1096-4959(03)00176-3.
- Ioannes, Pablo de; Moltedo, Bruno; Oliva, Harold; Pacheco, Rodrigo; Faunes, Fernando; Ioannes, Alfredo E. de; Becker, María Inés (2004): Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (25), S. 26134–26142. DOI: 10.1074/jbc.M400903200.
- Irisarri, Iker; Uribe, Juan E.; Eernisse, Douglas J.; Zardoya, Rafael (2020): A mitogenomic phylogeny of chitons (Mollusca: Polyplacophora). In: *BMC evolutionary biology* 20 (1), S. 22. DOI: 10.1186/s12862-019-1573-2.
- Jackson, Daniel J.; Wörheide, Gert; Degnan, Bernard M. (2007): Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. In: *BMC Evol Biol* 7, S. 160. DOI: 10.1186/1471-2148-7-160.
- Jiang, Zhihua; Zhou, Xiang; Li, Rui; Michal, Jennifer J.; Zhang, Shuwen; Dodson, Michael V. et al. (2015): Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72 (18), S. 3425–3439. DOI: 10.1007/s00018-015-1934-y.
- Jumper, John; Evans, Richard; Pritzel, Alexander; Green, Tim; Figurnov, Michael; Ronneberger, Olaf et al. (2021): Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. In: *Nature* 596 (7873), S. 583–589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- Kaas, Piet; Strack, Herman L.; van Belle, Richard A. (2006): Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora), Volume 6 Family Schizochitonidae. Leiden, Boston: BRILL (Brill Book Archive Part 1, ISBN).
- Kano, Yasunori (2008): Vetigastropod phylogeny and a new concept of Seguenzioidea: independent evolution of copulatory organs in the deep-sea habitats., // Vetigastropod phylogeny and a new concept of Seguenzioidea: independent evolution of copulatory organs in the deep-sea habitats. In: *Zoologica Scripta* 37 (37 // 1), 1–21. DOI: 10.1111/j.1463-6409.2007.00316.x.

- Kato, Sanae; Matsui, Takashi; Gatsogiannis, Christos; Tanaka, Yoshikazu (2018): Molluscan hemocyanin: structure, evolution, and physiology. In: *Biophysical reviews* 10 (2), S. 191–202. DOI: 10.1007/s12551-017-0349-4.
- Kawagucci, S.; Miyazaki, J.; Noguchi, T.; Okamura, K.; Shibuya, T.; Watsuji, T. et al. (2016): Fluid chemistry in the Solitaire and Dodo hydrothermal fields of the Central Indian Ridge. In: *Geofluids* 16 (5), S. 988–1005. DOI: 10.1111/gfl.12201.
- Keller, H.; Lieb, Bp6; Altenhein, B.; Gebauer, D.; Richter, S.; Stricker, S.; Markl, J. (1999): Abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocyanin type 1 (HtH1). Organization of the approximately 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units f, g and h. In: *European journal of biochemistry* 264 (1), S. 27–38. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00564.x.
- Kelley, Joanna L.; Arias-Rodriguez, Lenin; Patacsil Martin, Dorrelyn; Yee, Muh-Ching; Bustamante, Carlos D.; Tobler, Michael (2016): Mechanisms Underlying Adaptation to Life in Hydrogen Sulfide-Rich Environments. In: *Mol Biol Evol* 33 (6), S. 1419–1434. DOI: 10.1093/molbev/msw020.
- Kenkel, Carly D.; Matz, Mikhail V. (2016): Gene expression plasticity as a mechanism of coral adaptation to a variable environment. In: *Nat Ecol Evol* 1 (1), S. 14. DOI: 10.1038/s41559-016-0014.
- Kenneth M. Towe, H. A. Lowenstam and M. H. Nesson (1963): Invertebrate Ferritin: Occurrence in Mollusca. In: *Science* Vol. 142 (No. 3588), pp. 63-64.
- Kim, Kyung-Suk; Webb, John; Macey, David J. (1986): Properties and role of ferritin in the hemolymph of the chiton *Clavariolites hirtosa*. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 884 (3), S. 387–394. DOI: 10.1016/0304-4165(86)90188-1.
- Kocot, Kevin M.; Cannon, Johanna T.; Todt, Christiane; Citarella, Mathew R.; Kohn, Andrea B.; Meyer, Achim et al. (2011): Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. In: *Nature* 477 (7365), S. 452–456. DOI: 10.1038/nature10382.
- Kocot, Kevin M.; Poustka, Albert J.; Stöger, Isabella; Halanych, Kenneth M.; Schrödl, Michael (2020): New data from Monoplacophora and a carefully-curated dataset resolve molluscan relationships. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 101. DOI: 10.1038/s41598-019-56728-w.
- Kocot, Kevin M.; Todt, Christiane; Mikkelsen, Nina T.; Halanych, Kenneth M. (2019): Phylogenomics of Aplousobranchia (Mollusca, Aculifera) and a solenogaster without a foot. In: *Proceedings. Biological sciences* 286 (1902), S. 20190115. DOI: 10.1098/rspb.2019.0115.
- Kremer, Natacha; Philipp, Eva E. R.; Carpentier, Marie-Christine; Brennan, Caitlin A.; Kraemer, Lars; Altura, Melissa A. et al. (2013): Initial symbiont contact orchestrates host-organ-wide transcriptional changes that prime tissue colonization. In: *Cell host & microbe* 14 (2), S. 183–194. DOI: 10.1016/j.chom.2013.07.006.
- Krug, Patrick J.; Caplins, Serena A.; Algosó, Krisha; Thomas, Kanique; Valdés, Ángel A.; Wade, Rachael et al. (2022): Phylogenomic resolution of the root of Panpulmonata, a hyperdiverse radiation of gastropods: new insight into the evolution of air breathing. In: *Proceedings. Biological sciences* 289 (1972), S. 20211855. DOI: 10.1098/rspb.2021.1855.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Niyaz C, and Tamura K (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. In: *Molecular Biology and Evolution* (35), S. 1547–1549.
- Kuroda, Reiko; Abe, Masanori (2020): The pond snail *Lymnaea stagnalis*. In: *EvoDevo* 11 (1), S. 24. DOI: 10.1186/s13227-020-00169-4.

- La Coba de Peña, Teodoro; Cárcamo, Claudia B.; Díaz, María I.; Brokordt, Katherina B.; Winkler, Federico M. (2016): Molecular characterization of two ferritins of the scallop *Argopecten purpuratus* and gene expressions in association with early development, immune response and growth rate. In: *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 198, S. 46–56. DOI: 10.1016/j.cbpb.2016.03.007.
- La Coba de Peña, Teodoro; Cárcamo, Claudia B.; Díaz, María I.; Winkler, Federico M.; Morales-Lange, Byron; Mercado, Luis; Brokordt, Katherina B. (2018): Cloning and molecular characterization of two ferritins from red abalone *Haliotis rufescens* and their expressions in response to bacterial challenge at juvenile and adult life stages. In: *Fish & shellfish immunology* 82, S. 279–285. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.08.030.
- Lambert, O.; Taveau, J. C.; Boisset, N.; Lamy, J. N. (1995): Three-dimensional reconstruction of the hemocyanin of the protobranch bivalve mollusc *Nucula hanleyi* from frozen-hydrated specimens. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 319 (1), S. 231–243. DOI: 10.1006/abbi.1995.1287.
- Lamy, J.; You, V.; Taveau, J. C.; Boisset, N.; Lamy, J. N. (1998): Intramolecular localization of the functional units of *Sepia officinalis* hemocyanin by immunoelectron microscopy. In: *Journal of molecular biology* 284 (4), S. 1051–1074. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2235.
- Lamy, Josette; Leclerc, Michele; Sizaret, Pierre Yves; Lamy, Jean; Miller, Karen I.; McParland, Reginald; van Holde, K. E. (1987): Octopus dofleini hemocyanin: structure of the seven-domain polypeptide chain. In: *Biochemistry* 26 (12), S. 3509–3518. DOI: 10.1021/bi00386a039.
- Lan, Yi; Sun, Jin; Chen, Chong; Sun, Yanan; Zhou, Yadong; Yang, Yi et al. (2021): Hologenome analysis reveals dual symbiosis in the deep-sea hydrothermal vent snail *Gigantopelta aegis*. In: *Nature communications* 12 (1), S. 1165. DOI: 10.1038/s41467-021-21450-7.
- Lan, Yi; Sun, Jin; Chen, Chong; Wang, Hao; Xiao, Yao; Perez, Maeva et al. (2022): Endosymbiont population genomics sheds light on transmission mode, partner specificity, and stability of the scaly-foot snail holobiont. In: *The ISME journal* 16 (9), S. 2132–2143. DOI: 10.1038/s41396-022-01261-4.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H. et al. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (21), S. 2947–2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Layer, Richard; McIntosh, J. (2006): Conotoxins: Therapeutic Potential and Application. In: *Marine Drugs* 4 (3), S. 119–142. DOI: 10.3390/md403119.
- Le, Si Quang; Gascuel, Olivier (2008): An improved general amino acid replacement matrix. In: *Molecular Biology and Evolution* 25 (7), S. 1307–1320. DOI: 10.1093/molbev/msn067.
- Lemche, Henning (1957): A New Living Deep-Sea Mollusc of the Cambro-Devonian Class Monoplacophora. In: *Nature* 179 (4556), S. 413–416. DOI: 10.1038/179413a0.
- Letunic, Ivica; Bork, Peer (2024): Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. In: *Nucleic acids research*. DOI: 10.1093/nar/gkae268.
- Li, H.; Zang, J.; Tan, X.; Wang, Z.; Du, M. (2020): *Crassostrea gigas* ferritin.
- Li, Juan; Li, Li; Zhang, Shoudu; Li, Jiale; Zhang, Guofan (2012): Three ferritin subunits involved in immune defense from bay scallop *Argopecten irradians*. In: *Fish & shellfish immunology* 32 (2), S. 368–372. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.10.030.

- Lieb, B.; Altenhein, B.; Lehnert, R.; Gebauer, W.; Markl, J. (1999): Subunit organization of the abalone *Haliotis tuberculata* hemocyanin type 2 (HtH2), and the cDNA sequence encoding its functional units d, e, f, g and h. In: *European journal of biochemistry* 265 (1), S. 134–144. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00694.x.
- Lieb, B.; Altenhein, B.; Markl, J. (2000): The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*). In: *The Journal of biological chemistry* 275 (8), S. 5675–5681. DOI: 10.1074/jbc.275.8.5675.
- Lieb, B.; Altenhein, B.; Markl, J.; Vincent, A.; van Olden, E.; van Holde, K. E.; Miller, K. I. (2001): Structures of two molluscan hemocyanin genes: significance for gene evolution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (8), S. 4546–4551. DOI: 10.1073/pnas.071049998.
- Lieb, Bernhard; Boisguérin, Valesca; Gebauer, Wolfgang; Markl, Jürgen (2004): cDNA sequence, protein structure, and evolution of the single hemocyanin from *Aplysia californica*, an opisthobranch gastropod. In: *Journal of molecular evolution* 59 (4), S. 536–545. DOI: 10.1007/s00239-004-2646-3.
- Lieb, Bernhard; Gebauer, Wolfgang; Gatsogiannis, Christos; Depoix, Frank; Hellmann, Nadja; Harasewych, Myrosław G. et al. (2010): Molluscan mega-hemocyanin: an ancient oxygen carrier tuned by a ~550 kDa polypeptide. In: *Frontiers in zoology* 7, S. 14. DOI: 10.1186/1742-9994-7-14.
- Lieb, Bernhard; Markl, Jürgen (2004): Evolution of molluscan hemocyanins as deduced from DNA sequencing. In: *Micron* 35 (1-2), S. 117–119. DOI: 10.1016/j.micron.2003.10.035.
- Lieb, Bernhard; Todt, Christiane (2008): Hemocyanin in mollusks--a molecular survey and new data on hemocyanin genes in Solenogastres and Caudofoveata. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 49 (1), S. 382–385. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.06.005.
- Lin, Yi-Tao; Li, Yi-Xuan; Sun, Yanan; Tao, Jun; Qiu, Jian-Wen (2023): A new species of the genus *Catillopecten* (Bivalvia: Pectinoidea: Propeamussiidae): morphology, mitochondrial genome, and phylogenetic relationship. In: *Front. Mar. Sci.* 10, Artikel 1168991. DOI: 10.3389/fmars.2023.1168991.
- Liu, Xiao-Li; Ye, Sen; Li, Hua-Wei; Lu, Bo; Yu, Yan-Qin; Fan, Yu-Peng et al. (2019): An H-ferritin from the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* and its potential role in iron metabolism. In: *Biometals* 32 (2), S. 251–264. DOI: 10.1007/s10534-019-00174-8.
- Liudmyla, Khrokalo; Olena, Chyhyrynets; Nadiia, Salitra (2022): Chemical properties of *Helix aspersa mucus* as a component of cosmetics and pharmaceutical products. In: *Materials Today: Proceedings* 62, S. 7650–7653. DOI: 10.1016/j.matpr.2022.02.217.
- Madeira, Fábio; Pearce, Matt; Tivey, Adrian R. N.; Basutkar, Prasad; Lee, Joon; Edbali, Ossama et al. (2022): Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. In: *Nucleic acids research*. DOI: 10.1093/nar/gkac240.
- Mangum, C. P.; Scott, J. L.; Miller, K. I.; van Holde, K. E.; Morse, M. P. (1987): Bivalve Hemocyanin: Structural, Functional, and Phylogenetic Relationships. In: *The Biological Bulletin* 173 (1), S. 205–221. DOI: 10.2307/1541873.
- Marean, Curtis W.; Bar-Matthews, Miryam; Bernatchez, Jocelyn; Fisher, Erich; Goldberg, Paul; Herries, Andy I. R. et al. (2007): Early human use of marine resources and pigment in South Africa during the Middle Pleistocene. In: *Nature* 449 (7164), S. 905–908. DOI: 10.1038/nature06204.

- Markl, J.; Savel-Niemann, A.; Wegener-Strake, A.; Sding, M.; Schneider, A.; Gebauer, W.; Harris, J. R. (1991): The role of two distinct subunit types in the architecture of keyhole limpet hemocyanin (KLH). In: *Naturwissenschaften* 78 (11), S. 512–514. DOI: 10.1007/BF01131401.
- Markl, Jürgen (2013): Evolution of molluscan hemocyanin structures. In: *Biochimica et biophysica acta* 1834 (9), S. 1840–1852. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.02.020.
- Markl, Jürgen; Decker, H. (1992): Molecular structure of the arthropod hemocyanins. In: *Blood and tissue oxygen carriers*: Springer, S. 325–376.
- Marshall, Gavin; Valtchev, Peter; Dehghani, Fariba; Gomes, Vincent G. (2016): Thermal denaturation and protein stability analysis of *Haliotis rubra* hemocyanin. In: *J Therm Anal Calorim* 123 (3), S. 2499–2505. DOI: 10.1007/s10973-015-4827-2.
- Martínez, Mariano; González-Aravena, Marcelo; Held, Christoph; Abele, Doris (2023): A molecular perspective on the invasibility of the southern ocean benthos: The impact of hypoxia and temperature on gene expression in South American and Antarctic *Aequiyoldia* bivalves. In: *Frontiers in physiology* 14, S. 1083240. DOI: 10.3389/fphys.2023.1083240.
- Mather, Jennifer A. (2008): Cephalopod consciousness: behavioural evidence. In: *Consciousness and cognition* 17 (1), S. 37–48. DOI: 10.1016/j.concog.2006.11.006.
- Matsuno, A.; Gai, Z.; Kato, K.; Tanaka, Y.; Yao, M. (2015): Crystal structure of squid hemocyanin.
- Melzer, Roland R.; Brandhuber, Peter; Zimmermann, Timo; Smola, Ulrich (2001): Farben aus dem Meer: Der Purpur. In: *Biologie in unserer Zeit* 31 (1), S. 30–39. DOI: 10.1002/1521-415X(200101)31:1<30::AID-BIUZ30>3.0.CO;2-G.
- Meyer, Achim; Todt, Christiane; Mikkelsen, Nina T.; Lieb, Bernhard (2010): Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. In: *BMC Evol Biol* 10 (1), S. 70. DOI: 10.1186/1471-2148-10-70.
- Miller, K. I.; Cuff, M. E.; Lang, W. F.; Varga-Weisz, P.; Field, K. G.; van Holde, K. E. (1998): Sequence of the Octopus dofleini hemocyanin subunit: structural and evolutionary implications. In: *Journal of molecular biology* 278 (4), S. 827–842. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1648.
- Miller, K. I.; Schabtach, E.; van Holde, K. E. (1990): Arrangement of subunits and domains within the Octopus dofleini hemocyanin molecule. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (4), S. 1496–1500. DOI: 10.1073/pnas.87.4.1496.
- Mizzaro-Wimmer, Maria; Salvini-Plawen, Luitfried (Hg.) (2001): *Praktische Malakologie*. Vienna, s.l.: Springer Vienna (Springer eBook Collection Life Science and Basic Disciplines).
- Moles, Juan; Cunha, Tauana Junqueira; Lemer, Sarah; Combosch, David J.; Giribet, Gonzalo (2021): Tightening the girdle: phylotranscriptomics of Polyplacophora. In: *J. Mollus. Stud.* 87 (2), Artikel eyab019. DOI: 10.1093/mollus/eyab019.
- Momenteau, M.; Rougée, M.; Loock, B. (1976): Five-coordinate iron-porphyrin as a model for the active site of hemoproteins. Characterization and coordination properties. In: *European journal of biochemistry* 71 (1), S. 63–76. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb11090.x.
- Morse, M. P.; Meyhöfer, E.; Otto, J. J.; Kuzirian, A. M. (1986): Hemocyanin respiratory pigment in bivalve mollusks. In: *Science (New York, N.Y.)* 231 (4743), S. 1302–1304. DOI: 10.1126/science.3945826.

Nagalakshmi, Ugrappa; Waern, Karl; Snyder, Michael (2010): RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. In: *Current protocols in molecular biology* Chapter 4, Unit 4.11.1-13. DOI: 10.1002/0471142727.mb0411s89.

Neiber, Marco T.; Glaubrecht, M. (2019): Unparalleled disjunction or unexpected relationships? Molecular phylogeny and biogeography of Melanopsidae (Caenogastropoda: Cerithioidea), with the description of a new family and a new genus from the ancient continent Zealandia. In: *Cladistics : the international journal of the Willi Hennig Society* 35 (4), S. 401–425. DOI: 10.1111/cla.12361.

Nixon, Marion; Young, J. Z. (2011, 2003): The brains and lives of cephalopods. Oxford, New York: Oxford University Press.

Oellermann, Michael; Strugnell, Jan M.; Lieb, Bernhard; Mark, Felix C. (2015): Positive selection in octopus haemocyanin indicates functional links to temperature adaptation. In: *BMC evolutionary biology* 15, S. 133. DOI: 10.1186/s12862-015-0411-4.

Okada, Satoshi; Chen, Chong; Watsuji, Tomo-o; Nishizawa, Manabu; Suzuki, Yohey; Sano, Yuji et al. (2019): The making of natural iron sulfide nanoparticles in a hot vent snail. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (41), S. 20376–20381. DOI: 10.1073/pnas.1908533116.

Olsson, C. A.; Chute, R.; Olsson, C. A.; Rao, C. N. (1974): Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. In: *J urol* 111 (111, No. 2 // 2), S. 173–176. DOI: 10.1016/s0022-5347(17)59919-x.

Oomen, Rebekah A.; Hutchings, Jeffrey A. (2017): Transcriptomic responses to environmental change in fishes: Insights from RNA sequencing. In: *FACETS* 2 (2), S. 610–641. DOI: 10.1139/facets-2017-0015.

Ozca, David; Irisarri, Iker; Todt, Christiane; Grande, Cristina; Zardoya, Rafael (2014): The complete mitochondrial genome of *Scutopus ventrolineatus* (Mollusca: Chaetodermomorpha) supports the Aculifera hypothesis. In: *BMC Evol Biol* 14, S. 197. DOI: 10.1186/s12862-014-0197-9.

Pagel, Mark (1999): The Maximum Likelihood Approach to Reconstructing Ancestral Character States of Discrete Characters on Phylogenies. In: *Systematic biology* 48 (3), S. 612–622. DOI: 10.1080/106351599260184.

Pardos-Blas, José Ramón; Tenorio, Manuel J.; Galindo, Juan Carlos G.; Zardoya, Rafael (2022): Comparative Venomics of the Cryptic Cone Snail Species *Virroconus ebraeus* and *Virroconus judaeus*. In: *Marine Drugs* 20 (2). DOI: 10.3390/md20020149.

Patwardhan, M. V. (1958): Role of ferrous iron in enzymatic transamination. In: *Nature* 181 (4603), S. 187.

Pearce, TIMOTHY A.; Örstan, Aydin (2006): Terrestrial gastropoda. In: *The Mollusks: A Guide to Their Study, Collection, and Preservation. American Malacological Society, Pittsburgh*, S. 261–285.

Penzlin, Heinz (2005): Lehrbuch der Tierphysiologie. 7., neu bearb. und erweit. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Petri, Helmut (1936): Die Geldformen der Südsee.(Schluß). In: *Anthropos* (H. 3./4), S. 509–554.

Plays, Marina; Müller, Sebastian; Rodriguez, Raphaël (2021): Chemistry and biology of ferritin. In: *Metallomics : integrated biometal science* 13 (5). DOI: 10.1093/mtomcs/mfab021.

- Pohle, Alexander; Kröger, Björn; Warnock, Rachel C. M.; King, Andy H.; Evans, David H.; Aubrechtová, Martina et al. (2022): Early cephalopod evolution clarified through Bayesian phylogenetic inference. In: *BMC biology* 20 (1), S. 88. DOI: 10.1186/s12915-022-01284-5.
- Ponder, Winston (Hg.) (2008): Phylogeny and evolution of the mollusca. Unter Mitarbeit von WINSTON F. PONDER und David R. Lindberg. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press.
- Ponder, Winston Frank (2019): *Biology and Evolution of the Mollusca, Volume 1*. Unter Mitarbeit von David R. Lindberg und Juliet Mary Ponder. Milton: CRC Press LLC. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=5981891>.
- PONDER, W. F.; Lindberg, David R.; Ponder, Juliet M. (2020): *Biology and evolution of the mollusca*. Boca Raton, London, New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Puillandre, N.; Bouchet, P.; Duda, T. F.; Kaufenstejn, S.; Kohn, A. J.; Olivera, B. M. et al. (2014): Molecular phylogeny and evolution of the cone snails (Gastropoda, Conoidea). In: *Molecular phylogenetics and evolution* 78, S. 290–303. DOI: 10.1016/j.ympev.2014.05.023.
- Ranneby, B. (1984): The maximum spacing method. An estimation method related to the maximum likelihood method. In: *Scandinavian Journal of Statistics* (Vol. 11, No. 2), S. 93–112. Online verfügbar unter <https://www.jstor.org/stable/4615946>.
- Reynolds, Patrick D. (2002): The Scaphopoda. In: *Advances in Marine Biology* 42, S. 137–236. DOI: 10.1016/S0065-2881(02)42014-7.
- Rivi, V.; Benatti, C.; Colliva, C.; Radighieri, G.; Brunello, N.; Tascetta, F.; Blom, J. M. C. (2020): *Lymnaea stagnalis* as model for translational neuroscience research: From pond to bench. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 108, S. 602–616. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2019.11.020.
- Robertson, JAMES D.; Wilbur, K. M.; Yonge, C. W. (1964): Osmotic and ionic regulation. In: *Physiology of mollusca* 1, S. 283–312.
- Rogers, Alex D.; Tyler, Paul A.; Connelly, Douglas P.; Copley, Jon T.; James, Rachael; Larter, Robert D. et al. (2012): The discovery of new deep-sea hydrothermal vent communities in the southern ocean and implications for biogeography. In: *PLoS biology* 10 (1), e1001234. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001234.
- Rondón, Johnma José; Pisarenco, Vadim A.; Ramón Pardos-Blas, José; Sánchez-Gracia, Alejandro; Zardoya, Rafael; Rozas, Julio (2024): Comparative genomic analysis of chemosensory-related gene families in gastropods. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 192, S. 107986. DOI: 10.1016/j.ympev.2023.107986.
- Roper, Clyde F. E.; Shea, Elizabeth K. (2013): Unanswered Questions About the Giant Squid *Architeuthis* (Architeuthidae) Illustrate Our Incomplete Knowledge of Coleoid Cephalopods *. In: *American Malacological Bulletin* 31 (1), S. 109–122. DOI: 10.4003/006.031.0104.
- Rosewater, J. (1970): Monoplacophora in the South atlantic ocean. In: *Science (New York, N.Y.)* 167 (3924), S. 1485–1486. DOI: 10.1126/science.167.3924.1485.
- Rudolf Kilius (Hg.) (1997): *Lexikon Marine Muscheln und Schnecken*. Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH & Co.
- Safavi-Hemami, Helena; Brogan, Shane E.; Olivera, Baldomero M. (2019): Pain therapeutics from cone snail venoms: From Ziconotide to novel non-opioid pathways. In: *Journal of proteomics* 190, S. 12–20. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.05.009.

- Sairi, Fareed; Valtchev, Peter; Gomes, Vincent G.; Dehghani, Fariba (2015): Distribution and characterization of rhogocyte cell types in the mantle tissue of *Haliotis laevigata*. In: *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* 17 (2), S. 168–179. DOI: 10.1007/s10126-014-9605-9.
- Salinas-Clarot, Karina; Gutiérrez, Alejandro P.; Núñez-Acuña, Gustavo; Gallardo-Escárate, Cristian (2011): Molecular characterization and gene expression of ferritin in red abalone (*Haliotis rufescens*). In: *Fish & shellfish immunology* 30 (1), S. 430–433. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.09.009.
- Salvini-Plawen, Luitfried (1986): Einige Solenogastres (Mollusca) der europäischen meiofauna. Online verfügbar unter <https://www.jstor.org/stable/41766795>.
- Salvini-Plawen, Luitfried V. (1997): Systematic Revision of The Epimeniidae (Mollusca: Solenogastres). In: *J. Mollus. Stud.* 63 (2), S. 131–155. DOI: 10.1093/mollus/63.2.131.
- Sasaki, Takenori; Warén, Anders; Kano, Yasunori; Okutani, Takashi; Fujikura, Katsunori (2010): Gastropods from Recent Hot Vents and Cold Seeps: Systematics, Diversity and Life Strategies. In: Steffen Kiel (Hg.): *The Vent and Seep Biota*, Bd. 33. Dordrecht: Springer Netherlands (Topics in Geobiology), S. 169–254.
- Schäfer, Gabriela Giannina; Grebe, Lukas Jörg; Depoix, Frank; Lieb, Bernhard (2021a): Hemocyanins of Muricidae: New 'Insights' Unravel an Additional Highly Hydrophilic 800 kDa Mass Within the Molecule. In: *Journal of molecular evolution* 89 (1-2), S. 62–72. DOI: 10.1007/s00239-020-09986-6.
- Schäfer, Gabriela Giannina; Grebe, Lukas Jörg; Schinkel, Robin; Lieb, Bernhard (2021b): The Evolution of Hemocyanin Genes in Caenogastropoda: Gene Duplications and Intron Accumulation in Highly Diverse Gastropods. In: *Journal of molecular evolution* 89 (9-10), S. 639–655. DOI: 10.1007/s00239-021-10036-y.
- Schäfer, Gabriela Giannina; Pedrini-Martha, Veronika; Jackson, Daniel John; Dallinger, Reinhard; Lieb, Bernhard (2021c): The evolution of hemocyanin genes in Tectipleura: a multitude of conserved introns in highly diverse gastropods. In: *BMC ecology and evolution* 21 (1), S. 36. DOI: 10.1186/s12862-021-01763-3.
- Schäfer, Gabriela Giannina; Pedrini-Martha, Veronika; Schnegg, Raimund; Dallinger, Reinhard; Jackson, Daniel John; Lieb, Bernhard (2019): Hemocyanin genes as indicators of habitat shifts in Panpulmonata? In: *Molecular phylogenetics and evolution* 130, S. 99–103. DOI: 10.1016/j.ympev.2018.10.014.
- Scheltema, Amélie H.; Ivanov, Dmitry L. (2009): A natural history of the deep-sea aplacophoran *Prochaetoderma yongei* and its relationship to confamilials (Mollusca, Prochaetodermatidae). In: *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 56 (19-20), S. 1856–1864.
- Schwabe, Enrico (2008): A summary of reports of abyssal and hadal Monoplacophora and Polyplacophora (Mollusca). In: *Zootaxa* 1866 (1). DOI: 10.11646/zootaxa.1866.1.10.
- Segal, Earl (1961): Acclimation in molluscs. In: *Am Zool*, S. 235–244.
- Seppälä, Otto; Walser, Jean-Claude; Cereghetti, Teo; Seppälä, Katri; Salo, Tiina; Adema, Coen M. (2021): Transcriptome profiling of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) for ecoimmunological research. In: *BMC genomics* 22 (1), S. 144. DOI: 10.1186/s12864-021-07428-1.
- Septer, Alecia N.; Wang, Yanling; Ruby, Edward G.; Stabb, Eric V.; Dunn, Anne K. (2011): The haem-uptake gene cluster in *Vibrio fischeri* is regulated by Fur and contributes to symbiotic colonization. In: *Environmental microbiology* 13 (11), S. 2855–2864. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02558.x.

- Sigwart, Julia D.; Lindberg, David R. (2015): Consensus and confusion in molluscan trees: evaluating morphological and molecular phylogenies. In: *Systematic biology* 64 (3), S. 384–395. DOI: 10.1093/sysbio/syu105.
- Sigwart, Julia D.; Lindberg, David R.; Chen, Chong; Sun, Jin (2021): Molluscan phylogenomics requires strategically selected genomes. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 376 (1825), S. 20200161. DOI: 10.1098/rstb.2020.0161.
- Sigwart, Julia D.; Schwabe, Enrico; Saito, Hiroshi; Samadi, Sarah; Giribet, Gonzalo (2010): Evolution in the deep sea: a combined analysis of the earliest diverging living chitons (Mollusca : Polyplacophora : Lepidopleurida). In: *Invert. Systematics* 24 (6), S. 560. DOI: 10.1071/IS10028.
- Smith, Stephen A.; Wilson, Nerida G.; Goetz, Freya E.; Feehery, Caitlin; Andrade, Sónia C. S.; Rouse, Greg W. et al. (2011): Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. In: *Nature* 480 (7377), S. 364–367. DOI: 10.1038/nature10526.
- Song, Hao; Wang, Yunan; Shao, Haojing; Li, Zhuoqing; Hu, Pinli; Yap-Chiongco, Meghan K. et al. (2023): Scaphopoda is the sister taxon to Bivalvia: Evidence of ancient incomplete lineage sorting. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120 (40), e2302361120. DOI: 10.1073/pnas.2302361120.
- Stein, Jeffrey L.; CARY, S. CRAIG; HESSLER, ROBERT R.; VETTER, RUSSELL D.; FELBECK, HORST; Ohta, Suguru; CHILDRESS, JAMES J. (1988): Chemoautotrophic Symbiosis in a Hydrothermal Vent Gastropod. In: *The Biological Bulletin* 174 (3), S. 373–378. DOI: 10.2307/1541963.
- Steiner, G.; Kabat, A. R. (2004): Catalog of species-group names of Recent and fossil Scaphopoda (Mollusca). Online verfügbar unter <https://www.vliz.be/imisdocs/publications/299090.pdf>.
- Stern, K. G. (1937): SPECTROSCOPY OF CATALASE. In: *The Journal of general physiology* 20 (4), S. 631–648. DOI: 10.1085/jgp.20.4.631.
- Streit, Klaus; GEIGER, DANIEL L.; Lieb, Bernhard (2006): MOLECULAR PHYLOGENY AND THE GEOGRAPHIC ORIGIN OF HALIOTIDAE TRACED BY HAEMOCYANIN SEQUENCES. In: *J. Mollus. Stud.* 72 (1), S. 105–110. DOI: 10.1093/mollus/eyi048.
- Streit, Klaus; Jackson, Daniel; Degnan, Bernard M.; Lieb, Bernhard (2005): Developmental expression of two Haliotis asinina hemocyanin isoforms. In: *Differentiation; research in biological diversity* 73 (7), S. 341–349. DOI: 10.1111/j.1432-0436.2005.00035.x.
- Strobel, Anneli; Hu, Marian Y. A.; Gutowska, Magdalena A.; Lieb, Bernhard; Lucassen, Magnus; Melzner, Frank et al. (2012): Influence of temperature, hypercapnia, and development on the relative expression of different hemocyanin isoforms in the common cuttlefish *Sepia officinalis*. In: *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology* 317 (8), S. 511–523. DOI: 10.1002/jez.1743.
- Strong, E. E.; Colgan, D. J.; Healy, J. M.; Lydeard, C.; PONDER, W. F.; Glaubrecht, M. (2011): Phylogeny of the gastropod superfamily Cerithioidea using morphology and molecules. In: *Zool J Linn Soc* 162 (1), S. 43–89. DOI: 10.1111/j.1096-3642.2010.00670.x.
- Sun, Jin; Chen, Chong; Miyamoto, Norio; Li, Runsheng; Sigwart, Julia D.; Xu, Ting et al. (2020a): The Scaly-foot Snail genome and implications for the origins of biomineralised armour. In: *Nature communications* 11 (1), S. 1657. DOI: 10.1038/s41467-020-15522-3.
- Sun, Jin; Zhou, Yadong; Chen, Chong; Kwan, Yick Hang; Sun, Yanan; Wang, Xuyang et al. (2020b): Nearest vent, dearest friend: biodiversity of Tiancheng vent field reveals cross-ridge similarities in the Indian Ocean. In: *Royal Society open science* 7 (3), S. 200110. DOI: 10.1098/rsos.200110.

- Tao, Chunhui; Li, Huaiming; Jin, Xiaobing; Zhou, Jianping; Wu, Tao; He, Yonghua et al. (2014): Seafloor hydrothermal activity and polymetallic sulfide exploration on the southwest Indian ridge. In: *Chin. Sci. Bull.* 59 (19), S. 2266–2276. DOI: 10.1007/s11434-014-0182-0.
- Taylor, A. C.; Davenport, J.; Allen, J. A. (1995): Anoxic survival, oxygen consumption and haemocyanin characteristics in the protobranch bivalve *Nucula sulcata* Bronn. In: *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology* 112 (2), S. 333–338. DOI: 10.1016/0300-9629(95)00106-9.
- Tentori, L. (1970): Myoglobin, with particular reference to the myoglobin of *Aplysia*. In: *The Biochemical journal* 119 (5), 33P-34P. DOI: 10.1042/bj1190033p.
- Terwilliger, N. B. (1998a): Functional adaptations of oxygen-transport proteins. In: *The Journal of Experimental Biology* 201 (Pt 8), S. 1085–1098. DOI: 10.1242/jeb.201.8.1085.
- Terwilliger, N. B.; Terwilliger, R. C.; Meyhöfer, E.; Morse, M. P. (1988): Bivalve hemocyanins--a comparison with other molluscan hemocyanins. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 89 (1), S. 189–195. DOI: 10.1016/0305-0491(88)90282-9.
- Terwilliger, Nora B. (1998b): Functional Adaptations of Oxygen-Transport Proteins. In: *The Journal of Experimental Biology* (201), S. 1085–1098.
- Theil, Elizabeth C. (1987): Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. In: *Annual review of biochemistry* 56 (1), S. 289–315. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.001445>.
- Theil, Elizabeth C. (2011): Ferritin. In: Robert A. Scott (Hg.): *Encyclopedia of inorganic and bioinorganic chemistry*. [Hoboken, NJ]: John Wiley and Sons, Inc.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. In: *Nucleic acids research* 22 (22), S. 4673–4680. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673.
- Thonig, Anne; Oellermann, Michael; Lieb, Bernhard; Mark, Felix Christopher (2014): A new haemocyanin in cuttlefish (*Sepia officinalis*) eggs: sequence analysis and relevance during ontogeny. In: *EvoDevo* 5 (1), S. 6. DOI: 10.1186/2041-9139-5-6.
- Todt, Christiane; Okusu, Akiko; Schander, Christoffer; Schwabe, Enrico (2008): Solenogastres, Caudofoveata, and Polyplacophora. In: *Phylogeny and Evolution of the Mollusca* 4, S. 71–96.
- Toulmond, André; Jouin, Claude; Frescheville, Jacques de (1987): Hemocyanin of the protobranch bivalve mollusc *Nucula hanleyi* winckworth. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 88 (1), S. 71–74. DOI: 10.1016/0305-0491(87)90081-2.
- Towe, K. M.; Lowenstam, H. A.; NESSON, M. H. (1963): Invertebrate Ferritin: Occurrence in Mollusca. In: *Science (New York, N.Y.)* 142 (3588), S. 63–64. DOI: 10.1126/science.142.3588.63.
- Tripathy, Basudev; Sajan, S. K.; Mukhopadhyay, A. (2018): Mollusca of Indian Himalaya. Online verfügbar unter https://www.researchgate.net/profile/sheikh-sajan/publication/324983359_mollusca_of_indian_himalaya.
- Truemen, E. R. (1983): Locomotion in Molluscs. In: *The Mollusca*: Elsevier, S. 155–198.
- UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023 (2023). In: *Nucleic acids research* 51 (D1), D523-D531.

- van Dover, Cindy Lee (2000): The ecology of deep-sea hydrothermal vents. Princeton, N.J., Chichester: Princeton University Press. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/description/prin021/99016545.html>.
- van Dover, Cindy Lee; German, C. R.; Speer, K. G.; Parson, L. M.; Vrijenhoek, R. C. (2002): Evolution and biogeography of deep-sea vent and seep invertebrates. In: *Science* 295 (5558), S. 1253–1257. DOI: 10.1126/science.1067361.
- van Dover, Cindy Lee; Humphris, S. E.; Fornari, D.; Cavanaugh, C. M.; Collier, R.; Goffredi, S. K. et al. (2001): Biogeography and ecological setting of Indian Ocean hydrothermal vents. In: *Science* 294 (5543), S. 818–823. DOI: 10.1126/science.1064574.
- van Holde, K. E.; Miller, K.; Schabtach, E.; Libertini, L. (1991): Assembly of Octopus dofleini hemocyanin. A study of the kinetics by sedimentation, light scattering and electron microscopy. In: *Journal of molecular biology* 217 (2), S. 307–321. DOI: 10.1016/0022-2836(91)90545-H.
- van Holde, K. E.; Miller, K. I. (1982): Haemocyanins. In: *Quarterly reviews of biophysics* 15 (1), S. 1–129. DOI: 10.1017/S0033583500002705.
- van Holde, K. E.; Miller, Karen I. (1995): Hemocyanins. In: *Advances in Protein Chemistry Volume 47, Bd. 47: Elsevier (Advances in Protein Chemistry)*, S. 1–81.
- Varadi, Mihaly; Anyango, Stephen; Deshpande, Mandar; Nair, Sreenath; Natassia, Cindy; Yordanova, Galabina et al. (2022): AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. In: *Nucleic acids research* 50 (D1), D439-D444. DOI: 10.1093/nar/gkab1061.
- Varney, Rebecca M.; Speiser, Daniel I.; McDougall, Carmel; Degnan, Bernard M.; Kocot, Kevin M. (2021): The Iron-Responsive Genome of the Chiton *Acanthopleura granulata*. In: *Genome biology and evolution* 13 (1). DOI: 10.1093/gbe/evaa263.
- Vinther, Jakob; Sperling, Erik A.; Briggs, Derek E. G.; Peterson, Kevin J. (2012): A molecular palaeobiological hypothesis for the origin of aplacophoran molluscs and their derivation from chiton-like ancestors. In: *Proceedings. Biological sciences* 279 (1732), S. 1259–1268. DOI: 10.1098/rspb.2011.1773.
- Vosloo, Andre; Laas, Anél; Vosloo, Dalene (2013): Differential responses of juvenile and adult South African abalone (*Haliotis midae* Linnaeus) to low and high oxygen levels. In: *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 164 (1), S. 192–199. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.09.002.
- W.O.R.M.S. Online verfügbar unter <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=browser&id=2&id=51#focus>.
- Wang, Yihang; Zhou, Shanshan; Liu, Tianyu; Chen, Muyan; Zhang, Xiumei (2020): De novo transcriptome analysis of stressed blood clam (*Anadara broughtonii*) and identification of genes associated with hemoglobin. In: *Genes & genomics* 42 (2), S. 189–202. DOI: 10.1007/s13258-019-00887-7.
- Warén, Anders; Bengtson, Stefan; Goffredi, Shana K.; van Dover, Cindy L. (2003): A hot-vent gastropod with iron sulfide dermal sclerites. In: *Science* 302 (5647), S. 1007. DOI: 10.1126/science.1087696.
- Warnke, Kerstin Martina; Meyer, Achim; Ebner, Bettina; Lieb, Bernhard (2011): Assessing divergence time of Spirulida and Sepiida (Cephalopoda) based on hemocyanin sequences. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 58 (2), S. 390–394. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.11.024.

- Watanabe, Hiromi; Beedesse, Girish (2015): Vent Fauna on the Central Indian Ridge. In: Jun-ichiro Ishibashi, Kyoko Okino und Michinari Sunamura (Hg.): Subseafloor Biosphere Linked to Hydrothermal Systems. Tokyo: Springer Japan, S. 205–212.
- Webber, Dale M.; Aitken, Jill P.; O'Dor, Ronald K. (2000): Costs of locomotion and vertic dynamics of cephalopods and fish. In: *Physiological and Biochemical Zoology* 73 (6), S. 651–662.
- Whelan, Simon; Goldman, Nick (2001): A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. In: *Molecular Biology and Evolution* 18 (5), S. 691–699.
- WHO: FASCIOLIASIS. Foodborne parasitic infections. Online verfügbar unter www.oie.int/diseasecard_fasciola.
- WHO: Schistosomiasis (Bilharzia). Online verfügbar unter <https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis>.
- Wilbur, Karl M.; Hochachka, Peter W. (1983): The Mollusca. New York, London: Academic.
- Williams, Suzanne T. (2012): Advances in molecular systematics of the vetigastropod superfamily Trochoidea. In: *Zoologica Scripta* 41 (6), S. 571–595. DOI: 10.1111/j.1463-6409.2012.00552.x.
- Williams, Suzanne T.; Karube, Satoshi; Ozawa, Tomowo (2008): Molecular systematics of Vetigastropoda: Trochidae, Turbinidae and Trochoidea redefined. In: *Zoologica Scripta* 37 (5), S. 483–506. DOI: 10.1111/j.1463-6409.2008.00341.x.
- Wilson, N. G.; Huang, D.; Goldstein, M. C.; Cha, H.; Giribet, G.; Rouse, G. W. (2009): Field collection of *Laevipilina hyalina* McLean, 1979 from southern California, the most accessible living monoplacophoran. In: *J. Mollus. Stud.* 75 (2), S. 195–197. DOI: 10.1093/mollus/eyp013.
- Wilson, Nerida G.; Rouse, Greg W.; Giribet, Gonzalo (2010): Assessing the molluscan hypothesis Serialia (Monoplacophora+Polyplacophora) using novel molecular data. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 54 (1), S. 187–193. DOI: 10.1016/j.ympev.2009.07.028.
- Wu, Jiadai; Cunningham, Anthony L.; Dehghani, Fariba; Diefenbach, Russell J. (2016): Comparison of *Haliotis rubra* hemocyanin isoforms 1 and 2. In: *Gene Reports* 4, S. 123–130. DOI: 10.1016/j.genrep.2016.04.011.
- Xu, Wenjie; Zhu, Chenglong; Gao, Xueli; Wu, Baosheng; Xu, Han; Hu, Mingliang et al. (2023): Chromosome-level genome assembly of hadal snailfish reveals mechanisms of deep-sea adaptation in vertebrates. In: *eLife* 12. DOI: 10.7554/eLife.87198.
- Xu, Yibin; Zeng, Sheng; Meng, Yuanzheng; Yang, Deyuan; Yang, Shengchang (2024): The mitochondrial genome of *Huaaristarchorum* (Heude, 1889) (Gastropoda, Cerithioidea, Semisulcospiridae) and its phylogenetic implications. In: *ZK* 1192, S. 237–255. DOI: 10.3897/zookeys.1192.116269.
- Yao, Haimin; Dao, Ming; Imholt, Timothy; Huang, Jamie; Wheeler, Kevin; Bonilla, Alejandro et al. (2010): Protection mechanisms of the iron-plated armor of a deep-sea hydrothermal vent gastropod. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (3), S. 987–992. DOI: 10.1073/pnas.0912988107.
- Yao, Tuo; Zhao, Man-Man; He, Jian; Han, Tao; Peng, Wen; Zhang, Han et al. (2019): Gene expression and phenoloxidase activities of hemocyanin isoforms in response to pathogen infections in abalone *Haliotis diversicolor*. In: *International journal of biological macromolecules* 129, S. 538–551. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.013.

- Yap-Chiongco, Meghan K.; Bergmeier, Franziska S.; Roberts, Nickellaus G.; Jörger, Katharina M.; Kocot, Kevin M. (2024): Phylogenomic reconstruction of Solenogastres (Mollusca, Aplacophora) informs hypotheses on body size evolution. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 194, S. 108029. DOI: 10.1016/j.ympev.2024.108029.
- York, J. L.; Bearden, A. J. (1970): Active site of hemerythrin. Iron electronic states and the binding of oxygen. In: *Biochemistry* 9 (23), S. 4549–4554. DOI: 10.1021/bi00825a014.
- Zapata, Felipe; Wilson, Nerida G.; Howison, Mark; Andrade, Sónia C. S.; Jörger, Katharina M.; Schrödl, Michael et al. (2014): Phylogenomic analyses of deep gastropod relationships reject Orthogastropoda. In: *Proceedings. Biological sciences* 281 (1794), S. 20141739. DOI: 10.1098/rspb.2014.1739.
- Zhang, Lili; Gu, Xinyu; Chen, Chong; He, Xing; Qi, Ying; Sun, Jin (2024): Mitogenome-based phylogeny of the gastropod order Neomphalida points to multiple habitat shifts and a Pacific origin. In: *Front. Mar. Sci.* 10, Artikel 1341869. DOI: 10.3389/fmars.2023.1341869.
- Zhang, Tianzhe; Wang, Yunan; Song, Hao (2023): The Complete Mitochondrial Genome and Gene Arrangement of the Enigmatic Scaphopod *Pictodentalium verneidei*. In: *Genes* 14 (1). DOI: 10.3390/genes14010210.
- Zhang, Yong; Meng, Qingxiong; Jiang, Tiemin; Wang, Hongzhong; Xie, Liping; Zhang, Rongqing (2003): A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 135 (1), S. 43–54. DOI: 10.1016/S1096-4959(03)00050-2.
- Zhang, Yueyue; Zhang, Ru; Zou, Jiajun; Hu, Xiaoli; Wang, Shi; Zhang, Lingling; Bao, Zhenmin (2013): Identification and characterization of four ferritin subunits involved in immune defense of the Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*). In: *Fish & shellfish immunology* 34 (5), S. 1178–1187. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.01.023.
- Zhong, Zhaoyan; Lan, Yi; Chen, Chong; Zhou, Yadong; Linse, Katrin; Li, Runsheng; Sun, Jin (2022): New mitogenomes in deep-water endemic Cocculinida and Neomphalida shed light on lineage-specific gene orders in major gastropod clades. In: *Front. Ecol. Evol.* 10, Artikel 973485. DOI: 10.3389/fevo.2022.973485.
- Zoysa, Mahanama de; Lee, Jehee (2007): Two ferritin subunits from disk abalone (*Haliotis discus discus*): cloning, characterization and expression analysis. In: *Fish & shellfish immunology* 23 (3), S. 624–635.

Danksagung

Ich danke [REDACTED] für die einmalige Chance diese Arbeit zu verfassen. Die konstruktiven Gespräche und anregenden Diskussionen haben mich sehr weitergebracht.

Außerdem danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen der AG [REDACTED] Ihre Unterstützung, Ratschläge und aufmunternden Worte.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie, meinen Kindern für ihr Verständnis, besonders meinem Vater für die vielfältige Unterstützung und sein Glaube an mich und meinem Bruder [REDACTED] für sein Lektorat.

Lebenslauf

Anschrift

Silke Gabel-Scheurich

Geburtsdatum/-Ort
Staatsangehörigkeit

Studium/Wissenschaftlicher Werdegang:

[REDACTED]

Kaufmännische Berufspraxis:

[REDACTED]

Betriebliche Ausbildung und Schulabschluss:

[REDACTED]

[REDACTED]

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit Hilfe der genannten Mittel angefertigt wurde. Bei allen von mir durchgeführten Analysen und Untersuchungen habe ich die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis, laut der Satzung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz eingehalten.

Ort, Datum

Silke Gabel-Scheurich