

# **„Charakterisierung von Arthropodenhämocyaninen“**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Silke Hagner-Holler**  
Geboren am 15.09.1968 in Ingelheim

Mainz, November 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12. 2004

# Inhaltsverzeichnis

|           |                                                         |           |
|-----------|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung .....</b>                                 | <b>1</b>  |
| 1.1       | Die respiratorischen Proteine .....                     | 1         |
| 1.2       | Die Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden .....       | 2         |
| 1.3       | Evolution der Hämocyanin-Superfamilie .....             | 3         |
| 1.4       | Struktur von Arthropodenhämocyaninen .....              | 4         |
| 1.5       | Vorkommen von Arthropodenhämocyaninen .....             | 5         |
| 1.5.1     | Hämocyanine bei Cheliceraten .....                      | 6         |
| 1.5.2     | Hämocyanine bei Crustaceen .....                        | 6         |
| 1.5.3     | Hämocyanine bei Myriapoden .....                        | 7         |
| 1.5.4     | Hämocyanine bei Onychophoren .....                      | 7         |
| 1.5.5     | Hämocyanine bei Insekten? .....                         | 8         |
| 1.6       | Hexamerine bei Insekten .....                           | 8         |
| 1.7       | Funktionen des Hämocyanins .....                        | 9         |
| 1.8       | Bildungsort des Hämocyanins .....                       | 9         |
| 1.9       | Ziele der vorliegenden Arbeit .....                     | 10        |
| <b>2.</b> | <b>Material und Methoden .....</b>                      | <b>11</b> |
| 2.1       | Versuchstiere .....                                     | 11        |
| 2.1.1     | Myriapoden .....                                        | 11        |
| 2.1.2     | Crustaceen .....                                        | 12        |
| 2.1.3     | Insekten .....                                          | 12        |
| 2.1.4     | Cheliceraten .....                                      | 13        |
| 2.2       | Verwendete Chemikalien und Geräte .....                 | 15        |
| 2.3       | Allgemeine proteinbiochemische Methoden .....           | 16        |
| 2.3.1     | Entnahme der Hämolymphe .....                           | 16        |
| 2.3.2     | Bestimmung der Proteinkonzentration .....               | 16        |
| 2.3.2.1   | Extinktionsmessung .....                                | 16        |
| 2.3.2.2   | Proteinbestimmung nach Bradford .....                   | 17        |
| 2.3.3     | Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....             | 17        |
| 2.3.3.1   | SDS-Polyacrylamidelektrophorese .....                   | 17        |
| 2.3.3.2   | Herstellung von zweidimensionalen Gelen (2D-Gele) ..... | 19        |
| 2.3.4     | Färbung der Gele mit Coomassie .....                    | 20        |
| 2.4       | „Semidry“ Western-Blot .....                            | 21        |
| 2.5       | Sauerstoffbindungskinetik .....                         | 22        |

|          |                                                                        |    |
|----------|------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6      | Mikrobiologische Methoden .....                                        | 22 |
| 2.6.1    | Bakterienstämme und Vektoren .....                                     | 22 |
| 2.6.2    | Glycerinkulturen.....                                                  | 24 |
| 2.6.3    | Plattenkulturen.....                                                   | 24 |
| 2.6.4    | Flüssigkulturen.....                                                   | 24 |
| 2.6.5    | Herstellung kompetenter Bakterien .....                                | 25 |
| 2.6.6    | Transformation kompetenter Bakterien .....                             | 25 |
| 2.7      | Allgemeine molekularbiologische Methoden .....                         | 26 |
| 2.7.1    | Fällung von Nukleinsäuren.....                                         | 26 |
| 2.7.2    | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....                       | 26 |
| 2.7.3    | Präparation von Plasmid-DNA .....                                      | 27 |
| 2.7.4    | Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen.....                            | 27 |
| 2.7.5    | Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden .....                    | 27 |
| 2.7.6    | Gelelektrophorese.....                                                 | 28 |
| 2.7.6.1  | DNA-Gelelektrophorese .....                                            | 28 |
| 2.7.6.2  | RNA-Gelelektrophorese .....                                            | 28 |
| 2.7.7    | DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....                                  | 29 |
| 2.8      | Präparation von RNA.....                                               | 30 |
| 2.8.1    | RNA-Präparation nach der GTC-Methode .....                             | 30 |
| 2.8.2    | Präparation von poly-(A) <sup>+</sup> -RNA .....                       | 31 |
| 2.9      | Synthese von cDNA-Banken .....                                         | 32 |
| 2.9.1    | Erststrangsynthese .....                                               | 32 |
| 2.9.2    | Zweitstrangsynthese .....                                              | 32 |
| 2.9.3    | Größenfraktionierung .....                                             | 33 |
| 2.9.4    | Ligation in die Vektorarme und Verpackung.....                         | 33 |
| 2.9.5    | Amplifikation der cDNA-Bank.....                                       | 34 |
| 2.10     | Screening von cDNA-Banken .....                                        | 35 |
| 2.10.1   | Antikörperscreening .....                                              | 35 |
| 2.10.2   | Sondenscreening.....                                                   | 36 |
| 2.10.3   | <i>In vivo</i> -Excision .....                                         | 38 |
| 2.11     | PCR-Techniken .....                                                    | 39 |
| 2.11.1   | Primerdesign.....                                                      | 40 |
| 2.11.2   | PCR-Methoden auf RNA.....                                              | 40 |
| 2.11.2.1 | One-Step-RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion) ..... | 40 |
| 2.11.2.2 | 5' RACE (Rapid Amplifikation of cDNA Ends) .....                       | 41 |

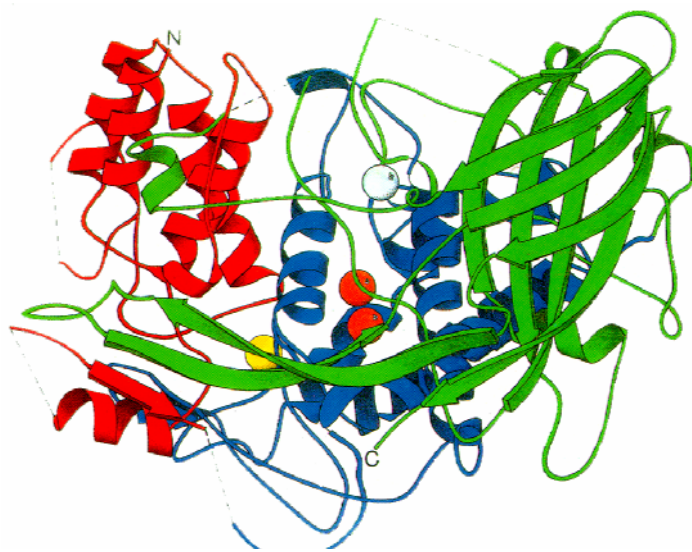
|           |                                                                                            |           |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.12      | Klonierung von PCR-Fragmenten .....                                                        | 41        |
| 2.13      | DNA-Sequenzierung.....                                                                     | 42        |
| 2.14      | Expression von Proteinen.....                                                              | 42        |
| 2.15      | Molekulare Sequenzanalyse.....                                                             | 43        |
| 2.16      | Molekulare Phylogenie.....                                                                 | 44        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse .....</b>                                                                    | <b>46</b> |
| 3.1       | Hämocyanine der Myriapoden .....                                                           | 46        |
| 3.1.1     | Charakterisierung des Hämocyanins von <i>Archispirostreptus gigas</i> .....                | 46        |
| 3.1.2     | Charakterisierung der Hämocyaninuntereinheiten von <i>Scutigera coleoptrata</i> .....      | 50        |
| 3.2       | Hämocyanine der Cheliceraten.....                                                          | 53        |
| 3.2.1     | Charakterisierung der Hämocyaninuntereinheiten von <i>Limulus polyphemus</i> .....         | 53        |
| 3.3       | Hämocyanine der Crustaceen.....                                                            | 61        |
| 3.3.1     | Charakterisierung des Hämocyanins von <i>Gammarus roeseli</i> .....                        | 61        |
| 3.4       | Hämocyanine der Insekten .....                                                             | 63        |
| 3.4.1     | Charakterisierung der Hämocyaninuntereinheiten von <i>Perla marginata</i> .....            | 63        |
| 3.4.2     | Charakterisierung der Hämocyaninuntereinheiten von <i>Thermobia domestica</i> .....        | 70        |
| 3.4.3     | Übersicht der auf Hämocyanin untersuchten Insektenspezies .....                            | 73        |
| 3.5       | Hexamerine der Insekten.....                                                               | 74        |
| 3.5.1     | Die Hexamerine von <i>Perla marginata</i> .....                                            | 74        |
| 3.5.2     | Die Hexamerine von <i>Thermobia domestica</i> .....                                        | 80        |
| 3.6       | Charakterisierung der Phenoloxidase des Onychophoren <i>Epiperatus spec.</i> .....         | 82        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion .....</b>                                                                    | <b>84</b> |
| 4.1       | Hämocyanine der Myriapoden .....                                                           | 84        |
| 4.1.1     | Die Hämocyanine von <i>Archispirostreptus gigas</i> und <i>Scutigera coleoptrata</i> ..... | 85        |
| 4.1.2     | Phylogenie der Myriapoden-Hämocyanine.....                                                 | 89        |
| 4.2       | Hämocyanine der Cheliceraten.....                                                          | 93        |
| 4.2.1     | Die Hämocyaninuntereinheiten von <i>Limulus polyphemus</i> .....                           | 93        |
| 4.2.2     | Phylogenie der Cheliceraten-Hämocyanine .....                                              | 96        |
| 4.3       | Hämocyanine der Crustaceen.....                                                            | 100       |
| 4.3.1     | Das Hämocyanin von <i>Gammarus roeseli</i> .....                                           | 100       |
| 4.3.2     | Phylogenie der Crustaceenhämocyanine .....                                                 | 102       |

|           |                                                                                                |            |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.4       | Hämocyanine und Hexamerine der Insekten .....                                                  | 106        |
| 4.4.1     | Die Hämocyanine und Hexamerine von <i>Perla marginata</i> und <i>Thermobia domestica</i> ..... | 106        |
| 4.4.2     | Phylogenie der Hämocyanine und Hexamerine der Insekten .....                                   | 111        |
| 4.5       | Phenoloxidasen .....                                                                           | 117        |
| 4.5.1     | Die Phenoloxidase von <i>Epiperatus spec.</i> .....                                            | 117        |
| 4.6       | Evolution der Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoden.....                                      | 118        |
| 4.7       | Ausblick .....                                                                                 | 118        |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>                                                                   | <b>119</b> |
| <b>6.</b> | <b>Literatur.....</b>                                                                          | <b>121</b> |
| <b>7.</b> | <b>Anhang .....</b>                                                                            | <b>139</b> |
| 7.1       | Verwendete Abkürzungen .....                                                                   | 139        |
| 7.1.2     | Außerhalb der Stammbäume verwendete Speziesnamen.....                                          | 141        |
| 7.2       | Der genetische Code .....                                                                      | 141        |
| 7.3       | Abkürzungscodes der Aminosäuren .....                                                          | 142        |
| 7.4       | Abkürzungscodes für degenerierte Nukleotide.....                                               | 142        |
| 7.5       | Vektorkarten .....                                                                             | 143        |
| 7.5.1     | Vektorkarte des pBK-CMV-Vektors.....                                                           | 143        |
| 7.5.2     | Vektorkarte des pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> -Vektors .....                            | 144        |
| 7.5.3     | Vektorkarte des PQE 30-32 .....                                                                | 144        |
| 7.6       | Primer .....                                                                                   | 145        |
| 7.6.1     | Degenerierte Primer.....                                                                       | 145        |
| 7.6.2     | Andere Primer zur PCR .....                                                                    | 145        |
| 7.7       | Verwendete Antikörper .....                                                                    | 147        |
| 7.8       | Quellenverzeichnis der Internetabbildungen .....                                               | 148        |
| 7.9       | Bereits aus der Arbeit hervorgegangene Publikationen .....                                     | 149        |
| 7.10      | Multisequenzalignments .....                                                                   | 150        |
| 7.10.1    | Alignment der cDNA-Sequenzen des Hämocyanins von <i>Gammarus roeseli</i> ...                   | 150        |
| 7.10.2    | Zur Konstruktion der Stammbäume verwendete Alignments.....                                     | 155        |

# **1. Einleitung**

## **1.1 Die respiratorischen Proteine**

Mit der Freisetzung von Sauerstoff durch sauerstoffbildende Bakterien und Blaualgen in die Erdatmosphäre vor etwa 2 Milliarden Jahren (Campbell, 2003) waren die Voraussetzungen für die Evolution von Organismen geschaffen, die den Sauerstoff für ihre Atmung nutzen konnten. Anfangs noch klein und einfach strukturiert, ging die Entwicklung hin zu größeren, komplexeren Tieren, die nicht mehr ohne weiteres in der Lage waren, ihren Gasaustausch allein durch Diffusion zu bewerkstelligen. Eine Lösung dieses Problems war die Ausbildung eines offenen oder geschlossenen Kreislaufsystems, wie man es in vielen Tierstämmen finden kann. Dieses wurde zum Teil kombiniert mit respiratorischen Oberflächen, wie z.B. der Lunge, und/oder der Nutzung respiratorischer Proteine. Diese sind in der Lage, Sauerstoff reversibel mit Hilfe von Metallionen (Eisen oder Kupfer) zu binden und ihn so viel schneller an den Bedarfsort zu bringen, als dies mittels Diffusion möglich wäre. Darüber hinaus dienen respiratorische Proteine auch der Speicherung von Sauerstoff in Geweben. Man kann diese Sauerstofftransportierenden bzw. -speichernden Proteine in Globine, Hämerythrine und Hämocyanine einteilen. Das Vorhandensein von Myoglobin (das im Muskel als Sauerstoffspeicher dient) bei Vertebraten sowie von Hämoglobin in Invertebraten (intra- und extrazellulär) und Vertebraten (intrazellulär), war schon seit langem bekannt (Dickerson und Geis, 1983; Hardison, 1996). Andere Globine, wie das Neuro- und Cytoglobin, wurden erst in jüngerer Zeit entdeckt (Burmester et al., 2000, 2002). Bei den Globinen und dem Hämerythrin, welches bei einigen polychaeten Anneliden und den Priapuliden vorkommt, wird das Sauerstoffmolekül von Eisenatomen gebunden, bei Hämocyaninen besteht die O<sub>2</sub>-Bindungsstelle aus zwei Kupferatomen (Abb. 1.1). Hämocyanine kommen bei Arthropoden und Mollusken vor. Sie sind trotz der Ähnlichkeiten in den Sauerstoffbindungszentren in ihrer Struktur und Sequenz sehr unterschiedlich und nicht näher miteinander verwandt (Burmester, 2001; van Holde et al., 2001).



**Abb. 1.1: Modell der Tertiärstruktur einer nicht oxygenierten Untereinheit des Hämocyanins von *Limulus polyphemus*.**

Rotgefärbt ist die Domäne 1 dargestellt; in Blau die Domäne 2; in Grün die Domäne 3. Die  $\alpha$ -Helix ist als Spirale dargestellt, das  $\beta$ -Faltblatt als Pfeil.

Die roten Kugeln symbolisieren die Kupfer-Ionen; die weiße Kugel stellt ein Calcium-Ion dar, die gelbe Kugel ein Chlorid-Ion (aus Markl, 1996).

## 1.2 Die Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden

In der Hämocyanin-Superfamilie werden respiratorische und nichtrespiratorische Proteine mit ähnlicher Sequenz aber vielfältigen Funktionen zusammengefasst (Burmester und Scheller, 1996; Burmester, 2002). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in erster Linie mit den Arthropodenhämocyaninen und den Hexamerinen von Insekten.

*Hämocyanine:* Hämocyanine dienen vielen Arthropoden als Sauerstofftransportproteine und liegen zumeist in einer hohen Konzentration extrazellulär in der Hämolymphe vor. Im oxygenierten Zustand ist die Hämolymphe teilweise sichtbar blau, was auf den Kupfer-Sauerstoffkomplex zurückzuführen ist (Markl und Decker, 1992; siehe unter 1.3-1.6).

*Hexamerine und Hexamerinrezeptoren:* Sowohl Hexamerine als auch die Hexamerinrezeptoren sind, wie Sequenzvergleiche zeigen, nahe mit den Hämocyaninen verwandt (Burmester und Scheller, 1996). Sie haben ihre Kupferbindungszentren ver-

ren und sind somit nicht mehr in der Lage Sauerstoff reversibel zu binden (weiteres siehe unter 1.6).

*Phenoloxidasen:* Phenoloxidasen sind kupferhaltige Enzyme (Tyrosinasen) mit der Fähigkeit zur Sauerstoffumsetzung (z.B. Soederhall und Cerenius, 1998). Sie oxidieren Mono- und Diphenole mit molekularem Sauerstoff zu Chinonen. Phenoloxidasen spielen bei den Arthropoden eine wichtige Rolle in der Immunantwort und sind darüber hinaus wesentlich an der Wundheilung sowie der Sklerotisierung der Kutikula beteiligt (Melanisierung). Phenoloxidasen werden bei Bedarf aus einer Vorstufe, der Prophenoloxidasen (PPO) aktiviert, indem ein N-terminales Peptid abgespalten wird (Áspan et al., 1995). Sie sind innerhalb der Arthropoden in allen Gruppen bis auf die Cheliceraten zu finden. Phenoloxidasen und Hämocyanine weisen gerade im sauerstoffbindenden aktiven Zentrum große Gemeinsamkeiten auf, was auf eine enge Verwandtschaft der beiden Proteine hindeutet. Hämocyanine sind z.T. in der Lage auch Phenoloxidasaktivität zu entwickeln (Decker und Tuczec, 2000; Decker et al., 2001).

*Pseudohämocyanine (Cryptocyanine):* Hierbei handelt es sich, wie bei Hexamerinen, um Proteine, die ihre Fähigkeit zur Sauerstoffbindung verloren haben (Terwilliger et al., 1999; Burmester, 1999). Strukturell sind sie den Hämocyaninen sehr ähnlich. Pseudohämocyanine sind nur bei dekapoden Crustaceen zu finden. Es wird vermutet, dass sie hier eine Rolle im Häutungszyklus spielen, da ihr Gehalt in der Hämolymphe zu bestimmten Häutungsstadien sehr große Unterschiede aufweist (Terwilliger, 1999).

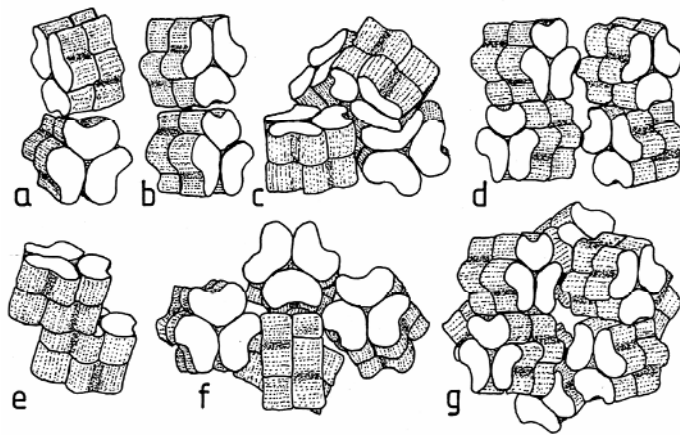
### **1.3 Evolution der Hämocyanin-Superfamilie**

Mollusken und Arthropodenhämocyanine entwickelten sich unabhängig voneinander aus verschiedenen Typen von kupferhaltigen Proteinen (Markl und Decker, 1992; Burmester, 2001). Die ersten Proteine der Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoden sind vor ca. 600 Millionen Jahren in einem gemeinsamen Vorläufer aller Gruppen (Onychophoren, Cheliceraten, Myriapoden, Crustaceen und Insekten) entstanden und hatten wahrscheinlich eine ähnliche Funktion wie die Phenoloxidasen. Diese werden als die ursprünglichsten Mitglieder der Hämocyaninsuperfamilie angesehen, eine Vermutung, die kürzlich durch die Entdeckung einer potentiellen Phenoloxidasen bei *Ciona*

*intestinalis* (Immesberger und Burmester, 2003) bestätigt werden konnte. Diese muss bereits in einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sein, bevor sich Arthropoden und Tunicaten getrennt haben.

#### **1.4 Struktur von Arthropodenhäemocyaninen**

Alle Häemocyanine bestehen aus Hexameren. Diese Hexamere sind, wie der Name nahelegt, aus sechs verschiedenen oder ähnlichen Untereinheiten aufgebaut, wobei jede Untereinheit aus 620-660 Aminosäuren besteht und damit eine Molekülmasse zwischen 70 und 80 kDa aufweist. Außer zu Monohexameren können sich Arthropodenhäemocyanine zu Komplexen aus 2x6 bis 8x6-meren zusammenlagern (Abb. 1.2). Der Vorteil dieser Strukturen besteht in einer großen Bindungskapazität für Sauerstoff, da jede Untereinheit ein Molekül Sauerstoff zwischen zwei Kupferionen binden kann, ohne dass die Osmolarität in der Hämolymphe zu sehr erhöht wird. Darüber hinaus erhöht sich die Kooperativität eines Häemocyaninproteins mit der Anzahl der Untereinheiten (Markl und Decker, 1992). Kooperativität bedeutet Zusammenarbeit der Untereinheiten, d.h. durch die Beladung einer Untereinheit mit Sauerstoff kommt es zu einer Änderung in der Konformation des Proteins und die übrigen Untereinheiten werden schneller be- bzw. entladen. Die Untereinheiten der Häemocyanine sind bei allen Arthropoden ähnlich aufgebaut. Bei der röntgenstrukturanalytischen Untersuchung des Häemocyanins von *Panulirus interruptus* (Gaykema et al., 1984, 1985; Volbeda und Hol, 1989) stellte man fest, dass die Untereinheiten Bohnenform besitzen. Sie bestehen aus 3 unterschiedlichen Domänen. Die erste Domäne besteht aus mehreren  $\alpha$ -Helices und umfaßt 150-180 Aminosäuren. Sie stabilisiert (besonders durch die hier liegenden Phenylalanine) wahrscheinlich die Sauerstoffbindung und schützt das aktive Zentrum. Dieses ist in der zweiten Domäne lokalisiert, die etwa 220 Aminosäuren groß ist. Das Sauerstoffbindungszentrum besteht aus 2 Kupferionen (CuA und CuB), die von 6 Histidinen koordinativ gebunden werden. Auch die Domäne 2 besteht vor allem aus  $\alpha$ -Helices. Im Gegensatz dazu ist die dritte Domäne eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, die ein siebensträngiges, antiparalleles "Barrel" bildet, wie es häufig in globulären Proteinen, darunter auch Immunglobulinen, vorkommt (Gaykema et al., 1984; Volbeda und Hol, 1989). Sie umfaßt etwa 260 Aminosäuren und dient wahrscheinlich der Stabilisierung des gesamten Häemocyanins (Markl und Decker, 1992; Abb. 1.1).



**Abb. 1.2: Quartärstruktur verschiedener Arthropodenhäemocyanine (aus Markl und Decker, 1992)**

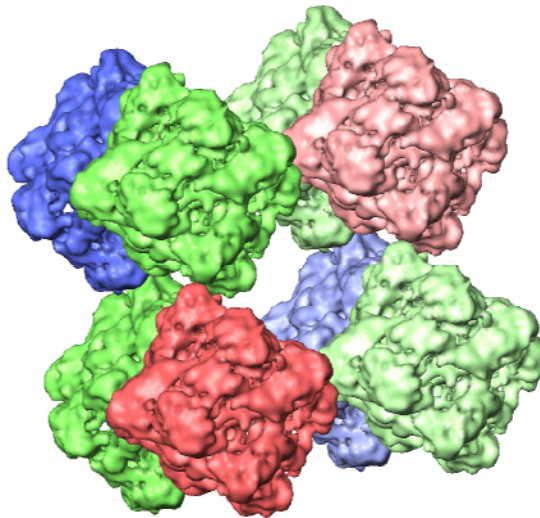
(a) Typisches 2x6 Häemocyanin vieler Dekapoda (z.B. *Homarus americanus*), (b) 2x6 Häemocyanin vieler Spinnen (z.B. *Cupiennius salei*), (c) 4x6 Häemocyanin einiger Garnelen (z.B. *Callinassa californiensis*), (d) typisches 4x6 Häemocyanin von *Eurypelma californicum* (Arachnida), (e) 2x6 Häemocyanin von *Squilla mantis* (Crustacea: Hoplocarida), (f) 6x6 Häemocyanin der Myriapoda (*Scutigera coleoptrata*), (g) 8x6 Häemocyanin der Xiphosura (z.B. *Limulus polyphemus*)

## 1.5 Vorkommen von Arthropodenhäemocyaninen

Häemocyanine sind seit langem bekannt. Erste Aufzeichnungen sind bereits aus den Anfängen des letzten Jahrhunderts bekannt (z.B. Kobert, 1903). Mitte der 1970iger Jahre begannen einige Forscher sich intensiver mit Häemocyaninen zu beschäftigen (z.B. Van Holde und Van Bruggen, 1971; Bonaventura et al., 1977), ein Trend, der sich bis heute fortsetzt. Mittlerweile sind Häemocyanine vieler Arthropoden gut charakterisiert. Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die Häemocyanine innerhalb der einzelnen Gruppen der Arthropoden gegeben werden.

### 1.5.1 Hämocyane bei Cheliceraten

Die Cheliceraten umfassen die Merostomata mit *Limulus spec.* und die Arachnida mit allen übrigen Ordnungen. Fast allen untersuchten Cheliceraten ist gemeinsam, dass sie Hämocyanin besitzen (z.B. Schneider et al., 1977; Lamy et al., 1977; Lamy et al., 1979; Markl et al., 1979). Die einzige Ausnahme bilden die Pantopoden (marine Seespinnen; Markl, 1986). Die Struktur ist innerhalb der einzelnen Gruppen relativ variabel. Bei *Limulus* ist das Hämocyanin ein 48-mer (Abb. 1.3), bei den ursprünglichen Spinnen und Skorpionen bildet es ein 24-mer, bei höheren Spinnen kann es ein 12-mer oder sogar ein 1x6-mer sein (Markl et al., 1986).



**Abb. 1.3:** 3-D-Rekonstruktion des 8x6-meren Hämocyanins von *Limulus polyphemus*. Die unterschiedlichen Farben kennzeichnen die einzelnen Hexamere (Persönliche Mitteilung von M. Stohr, 2004).

### 1.5.2 Hämocyane bei Crustaceen

Das Hämocyanin der malakostraken Crustaceen besteht entweder aus einem 1x6-mer, wie beispielsweise bei *Palinurus elephas* (Markl et al., 1979; Kusche et al., 2003; Meissner et al., 2003), aus einem 2x6-mer, wie typisch bei *Homarus americanus* (Markl et al., 1979) und *Astacus lepidactylus* (Markl et al., 1979), oder aus einem 4x6-mer, wie es bei *Callinassa californiensis* der Fall ist (Markl et al., 1979; Markl, 1986). Bei dekapoden Crustaceen können drei verschiedene Untereinheitstypen immunologisch unterschieden werden. Diese werden mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet (Markl et al., 1979, 1986).

### 1.5.3 Hämocyanine bei Myriapoden

Myriapoden verfügen in der Regel über ein gut ausgebildetes Tracheensystem. Es wurde davon ausgegangen, dass sie daher kein Hämocyanin für den Sauerstofftransport benötigen (Brusca und Brusca, 1990; Hilken, 1998). Als dann beim Spinnenläufer *Scutigera coleoptrata* ein 36-meres Hämocyanin entdeckt wurde, glaubte man an eine besondere Anpassung, da dieser Chilopode ein blind endendes Tracheensystem besitzt und darüber hinaus räuberisch lebt - ein Umstand, der schnelle Bewegungen und somit die Bereitstellung von großen Mengen Sauerstoff erfordert (Mangum et al., 1985; Mangum und Godette, 1986). Mittlerweile ist ein 6x6-meres Hämocyanin auch bei drei Diplopoden beschrieben. Bei *Spirostreptus spec.* konnte ein solches umfassend charakterisiert werden (Jaenicke et al., 1999; Kusche und Burmester, 2001).

### 1.5.4 Hämocyanine bei Onychophoren

Onychophoren (Stummelfüßer) sind Tiere, die aufgrund ihrer heimlichen Lebensweise und ihrer Seltenheit wenig untersucht sind. Sie werden mittlerweile von vielen Autoren zusammen mit den Tardigraden (Bärtierchen) als Proarthropoden zu den Arthropoden gezählt (Aguinaldo et al., 1997; Shultz und Regier, 2001). Da die Onychophoren, wie auch die Myriapoden und Insekten, über ein gut entwickeltes Tracheensystem verfügen, wurde bisher vermutet, dass sie kein Hämocyanin besitzen. Dies konnte widerlegt werden. Die Tiere besitzen ein hexameres Hämocyanin, welches die größte Ähnlichkeit in der Sequenz mit den Hämocyaninen der Cheliceraten aufweist (Kusche et al., 2002). Die phylogenetischen Untersuchungen zeigten eine Stellung des Onychophoren-hämocyanins basal zu den übrigen Arthropoden (Kusche et al., 2002).

### 1.5.5 Hämocyanine bei Insekten?

Wie bereits erwähnt, verfügen Insekten über ein gut entwickeltes Tracheensystem, welches ihnen erlaubt Sauerstoff sehr effektiv an die einzelnen Organe zu transportieren. Bei einigen wenigen Insekten, die unter hypoxischen Bedingungen leben, dient Hämoglobin als respiratorisches Protein (z.B. Weber und Vinogradov, 2001). Daher wurde das Vorhandensein von Hämocyanin bei Insekten bislang als überflüssig angesehen, man ging davon aus, dass dieses respiratorische Protein mit der Entwicklung des Tracheensystems verlorengeht. Im Jahr 1998 gelang es Forschern, ein embryonales Hämolympfprotein (EHP) in *Schistocerca americana* (Orthoptera) zu charakterisieren, welches neben konservierten Kupferbindungsstellen noch in anderen Sequenzbereichen große Übereinstimmungen mit den Hämocyaninen aus anderen Arthropodengruppen aufwies (Sanchez et al., 1998). Allerdings konnte das Protein weder in den übrigen Larvenstadien noch in adulten Tieren gefunden werden. Darüber hinaus wurde eine Sauerstoffbindung durch das EHP nicht nachgewiesen, daher konnte der Beweis, dass es sich um ein funktionelles Hämocyanin handelt, nicht erbracht werden.

### 1.6 Hexamerine bei Insekten

Hexamerine sind kupferlose Proteine der Insekten die als Energie- und Aminosäurespeicherproteine dienen (Telfer und Kunkel, 1991; Burmester, 1999). Sie sind z.B. während der Häutung oder in Zeiten ohne Nahrungsaufnahme in großen Mengen in der Hämolymphe nachweisbar. Einige Hexamerine sind auch in der Lage, kleine organische Komponenten, wie z.B. Riboflavin (Magee et al, 1994) oder Juvenilhormone (Braun und Wyatt, 1996) zu binden. Es handelt sich beim Hexamerin um ein 1x6-mer, das aus gleichen oder ähnlichen Untereinheiten besteht, die jeweils ein Molekulargewicht von etwa 80.000 Dalton besitzen (Scheller et al., 1990; Telfer und Kunkel, 1991). Hexamerine wurden in allen bislang untersuchten Insekten gefunden. Die Sequenzen der Hexamerine gleichen denen der Hämocyanine, so dass von einer engen Verwandtschaft ausgegangen wird (z.B. Burmester, 2002).

## 1.7 Funktionen des Hämocyanins

Die Hauptfunktion des Hämocyanins ist der Sauerstofftransport. Daneben werden aber noch andere Aufgaben vermutet, beispielsweise die Speicherung von Sauerstoff (Kusche und Burmester, 2001). Auch wird über eine Rolle bei der Immunabwehr von Arthropoden, vor allem bei Cheliceraten, diskutiert, da diese nicht über eine Phenoloxidase verfügen (Decker und Rimke, 1998; Decker et al., 2000; Nagai und Kawabata, 2000). Es wird außerdem vermutet, dass Hämocyanin bei Crustaceen eine Rolle im Häutungszyklus spielt (Terwilliger und Ryan, 2001). Spaltprodukte des Hämocyanins, welche eine fungizide bzw. bakterizide Wirkung aufwiesen, konnten in der Hämolymphe von Crustaceen (*Penaeus vannamei* bzw. *Pacifastacus leniusculus*) gefunden werden (Destoumieux-Garzon et al., 2001; Lee et al., 2003).

## 1.8 Bildungsort des Hämocyanins

Hämocyanin liegt im Blut von Arthropoden zumeist in relativ hohen Konzentrationen (20-100 mg/ml) vor. Diese schwanken sowohl zwischen den Tierarten als auch deren Entwicklungsstadien und Zustand (Hagermann, 1983; Senozan und Briggs, 1989). Die Freigabe des Hämocyanins aus den blutbildenden Zellen erfolgt auf unterschiedliche Weise. Entweder platzen die Zellen auf, wie bei den Cheliceraten und Onychophoren, oder das Hämocyanin verfügt über ein Signalpeptid, wie es für die Crustaceen typisch ist, aber auch bei Myriapoden vorkommt (Voit et al., 2000; Kusche und Burmester, 2001; Kusche et al., 2002). Auch die Synthesorte unterscheiden sich bei den einzelnen Arthropodengruppen. Während beim Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* spezielle Cyanocyten für die Hämocyaninsynthese vorhanden sind (Fahrenbach, 1970), wird es bei Vogelspinnen von Zellen in der inneren Herzwand gebildet (Kempton, 1983; Markl et al., 1990). Innerhalb der Crustaceen hat man bisher als Bildungsorte bei *Squilla mantis* Cyanocyten in den Augenstielen nachgewiesen (Schönenberger, 1980). Bei dekapoden Crustaceen fand man in der Mitteldarmdrüse Zellen, die Hämocyanin synthetisierten (Senkbeil und Wriston, 1981; Jacobs et al., 1984; Preaux et al., 1986).

## **1.9 Ziele der vorliegenden Arbeit**

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst eine möglichst große Anzahl Sequenzdaten vor allem aus den Arthropodengruppen zu erarbeiten, deren taxonomische Stellung bislang nicht eindeutig geklärt ist, bzw. in denen Hämocyanin bislang noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden Vertreter der Myriapoden, Crustaceen, Cheliceraten und Insekten untersucht. Da Hämocyanin sich, aufgrund seiner geringen Evolutionsrate, besonders gut dazu eignet, Veränderungen innerhalb der Hämocyaninsuperfamilie nachzuvollziehen, sollten die Ergebnisse der Sequenzierungen anschließend zu ausführlichen phylogenetischen Analysen genutzt werden um zur weiteren Aufklärung derer Verwandtschaftsbeziehung beizutragen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die meisten Versuchstiere wurden käuflich erworben oder stammten aus eigener Zucht. Einige Tiere wurden selbst gesammelt und bestimmt, oder freundlicherweise von Kollegen zur Verfügung gestellt. Bei allen Versuchstieren handelte es sich um Vertreter des Stammes Arthropoda.

#### 2.1.1 Myriapoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Myriapoden aus der Ordnung der Diplopoden und der Chilopoden untersucht. Beim größten Versuchstier handelte es sich um die ostafrikanische Tausendfüßlerart *Archispirostreptus gigas* (Myriapoda; Diplopoda), die eine Körperlänge bis 30 cm erreicht (Abb. 2.1). Die Tiere wurden bei konstanter Temperatur (28°C) und hoher Luftfeuchtigkeit in Terrarien der Größe 40 x 40 cm auf Blumenerde gehalten und mit Kartoffeln, Obst- und Gemüseresten gefüttert. Als Kalziumquelle, welche die Tiere besonders nach der Häutung benötigen, diente Käse. Weitere Diplopoden, die auf Hämocyanin untersucht wurden, waren einige Exemplare des Saftkuglers *Glomeris spec.* (Glomerida) sowie der Schnurfüßer *Julus spec.* (Julida; Julidae). Bei dem Chilopoden handelte es sich um den Spinnenläufer *Scutigera coleoptrata* (Scutigermorpha; Scutigeridae).



**Abb. 2.1:**

Der Diplopode *Archispirostreptus gigas* ist braunschwarz gefärbt und besitzt rote Beinpaare. Die Tiere werden bis zu zehn Jahre alt.

Quelle:

Siehe Anhang

### 2.1.2 Crustaceen

Innerhalb der Crustaceen wurde der Flußflohkrebs *Gammarus roeseli* (Gammaridae; Gammaridea; Amphipoda) untersucht (Abb. 2.2). Diese Art kommt recht häufig in Flüssen und Bächen vor und ist durch die charakteristische Überlappung der Segmente relativ einfach zu bestimmen. Der Flußflohkrebs konnte direkt in einem ortsnahen Bach gefunden und unter dem Binokular bestimmt werden.



**Abb. 2.2 :**  
Der Flußflohkrebs *Gammarus roeseli*. Gut zu erkennen sind die spitzen, sich überlappenden Segmente.  
Quelle:  
siehe Anhang

### 2.1.3 Insekten

Die Steinfliegenart *Perla marginata* (Plecoptera, Perlidae) kommt bei uns in sauberen, sauerstoffreichen und schnellfließenden Mittelgebirgsbächen vor (Abb. 2.3). Sie gilt als wichtige Nahrung für Fische der Forellenregion. Diese Steinfliegenart hat einen mehrjährigen Entwicklungszyklus, wobei sie die ersten drei Jahre ihres Daseins als Larve verbringt. Nach dem Schlüpfen folgt mit Paarung und Eiablage der letzte Lebensabschnitt. In dieser Zeit wird keine Nahrung mehr aufgenommen.

**Abb. 2.3:**  
Die Steinfliege *Perla marginata*. Die Abbildung zeigt ein adultes Tier. Typisches Kennzeichen sind die vier in Ruhe flach gefalteten Flügel.

Quelle:  
Siehe Anhang



Die ebenfalls als Versuchstiere verwendeten Ofenfische *Thermobia domestica* (Thysanura; Lepismatidae) sind eng mit den bekannten Silberfischen *Lepisma saccharina* (Thysanura; Lepismatidae) verwandt (Abb. 2.4). Sie lieben die Wärme und kommen daher nur dort vor, wo ausreichend hohe Temperaturen vorherrschen, wie z.B. in Bäckereien. Hierzulande werden sie vor allem als Futtertiere von Terrarienfreunden gezüchtet. Die Haltung der Ofenfische erfolgte in einem großen Glas mit etwas Küchenpapier und Pappe als Versteckmöglichkeit und Nahrungsquelle.



**Abb. 2.4:**  
Vertreter der Ofenfische (*Thermobia domestica*) sind durch ihre Färbung gut von Silberfischen zu unterscheiden.

Quelle:  
Siehe Anhang

#### 2.1.4 Cheliceraten

Innerhalb der Cheliceraten wurde der Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* (Merostomata; Xiphosura; Xiphosurida; Limulidae) als Versuchstier verwendet (Abb. 2.5). Die Tiere kommen ursprünglich an der amerikanischen Ostküste und in der Karibik vor. Die für diese Arbeit verwandten Pfeilschwanzkrebse wurden vom Marine Biological Laboratory (USA) bezogen. Die Hälterung erfolgte in Meerwasseraquarien bei 18°C. Das Meerwasser hat eine spezifische Dichte von 1.023, dieser Wert muss auch in Gefangenschaft eingehalten werden. Wichtig ist außerdem eine mindestens 10 cm hohe Sandschicht, in die sich die Tiere eingraben können. Die Fütterung erfolgte mit Fischfilet.

**Abb. 2.5:**

Pfeilschwanzkrebse (*Limulus polyphemus*) kommen im Frühjahr/Sommer an den Strand um zu laichen. Die urtümlichen Tiere sind an der Hufeisenform und dem typisch pfeilförmigen „Schwanz“ zu erkennen.

Quelle:

Siehe Anhang



## 2.2 Verwendete Chemikalien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bezogen und stammten, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Kits und Enzyme wurden von den Firmen Genecraft (Münster), Invitrogen (Groningen), Macherey und Nagel, Peqlab (Erlangen), Qiagen (Hilden), Sigma Aldrich (Darmstadt) und Stratagene (Heidelberg) bezogen.

### Folgende Geräte wurden benutzt:

|                     |                                                                                                                                      |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zentrifugen:        | Heraeus Biofuge pico, Rotor 3325 (Kendro GmbH, Hanau)<br>Heraeus Megafuge 1.0R, Rotor 3360<br>Eppendorf Centrifuge 5415R (Wesseling) |
| Photometer:         | Ultrospec Plus (Pharmacia LKB, Freiburg)<br>Biophotometer (Eppendorf, Köln)                                                          |
| Autoklav:           | Technoclav (Integra Biosciences, Fernwald)                                                                                           |
| pH-Meter:           | Digital-pH-Meter (Knick, Berlin)                                                                                                     |
| Thermocycler:       | Techne Progene (Techne, Cambridge, UK)<br>Biometra T-Gradient (Biometra, Göttingen)                                                  |
| Bakterienschüttler: | Bühler TH 25 (Fa. Edmund Bühler)                                                                                                     |
| Brutschrank:        | Memmert Modell 300 (Memmert, Schwabach)                                                                                              |

## 2.3 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Entnahme der Hämolymphe

Größere Tiere wurde zur Betäubung 1-2 h auf Eis gelegt und danach die Hämolymphe mit einer sterilen Kanüle entnommen. Bei den Insekten genügten 2 h im Kühlraum bei 8°C. Die Probenahme erfolgte bei den Myriapoden und *Gammarus* lateral zwischen den Segmenten, bei *Limulus* am dorsalen Sinus, bei *Astacus* an der Oberseite der Hinterleibsegmente und bei den Insekten dorsal hinter dem Kopfpanzer. Anschließend wurde die Hämolymphe in Stabilisierungspuffer gegeben und bei 4°C, und 13000 x g 10 Minuten abzentrifugiert, um die Blutzellen und Gewebereste zu sedimentieren. Danach konnte die Hämolymphe entweder direkt weiterverwendet oder bei –20°C eingefroren werden.

**Stabilisierungspuffer**    100 mM Tris  
                                  10 mM Ca<sup>2+</sup>  
                                  10 mM Mg<sup>2+</sup>  
                                  pH 7,8

### 2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

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

#### 2.3.2.1 Extinktionsmessung

Je nach Gehalt einer Proteinlösung an aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) absorbiert sie Licht im ultravioletten Bereich zwischen 200 und 300 nm. Durch die photooptische Proteinbestimmung bei 280 nm läßt sich der Proteingehalt einer Lösung grob abschätzen. Dabei geht man davon aus, dass 1 OD bei einer Schichtdicke von 1 cm etwa 1 mg/ml Hämocyanin entspricht (Markl, 1980). Hämocyanin besitzt ein zweites Absorptionsmaximum bei 340 nm, welches den oxigenierten Zustand des Mo-

leküls kennzeichnet und durch den Kupfer-Sauerstoff-Kupfer-Komplex zustande kommt. Die blaue Farbe des Hämocyanins wird außerdem durch ein weiteres Absorptionsmaximum des Kupfer-Komplexes im sichtbaren Bereich bei ca. 560 nm erzeugt.

#### **2.3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Durch die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) an Proteine wird unter sauren Bedingungen das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschoben. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit eignet sich diese Methode zur Bestimmung kleiner Proteinmengen im Bereich von 2 bis 20 µg.

#### **Herstellung der Bradford-Lösung**

Zunächst wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) in 50 ml 95% Ethanol p.a. gelöst, dann 100 ml 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  hinzugegeben und die Lösung mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Die Aufbewahrung erfolgte in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur.

#### **Durchführung der Proteinbestimmung**

Die Proteinlösung wurde mit Wasser auf 100 µl verdünnt und mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5 Minuten konnte die Extinktion bei 595 nm photometrisch gemessen werden. Als Standard diente Rinder Serum Albumin (BSA).

### **2.3.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

#### **2.3.3.1 SDS-Polyacrylamidelektrophorese**

Durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) kann man Proteine in einem elektrischen Feld allein aufgrund ihres Molekulargewichts auftrennen. Acrylamid ist nach Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und durch eine Katalyse mit Tetramethyldiamin (TEMED) in der Lage, lange Ketten zu bilden, die durch N,N'-Methylenbisacrylamid miteinander vernetzt werden. Durch die Variation der Acrylamid- und N,N'-Methylenbisacrylamid-Konzentration entstehen Netze unterschiedlicher Poren-

größe, in denen Proteine nach ihrer Größe getrennt werden können. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine in Anwesenheit des Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. SDS maskiert die Eigenladung der Proteine durch eine negativ geladene Hülle, so dass die Proteine nur aufgrund ihrer Größe im Gel aufgetrennt werden. Die zurückgelegte Strecke der Proteine im Gel ist etwa linear vom dekadischen Logarithmus der Molekülgrößen abhängig und lässt sich anhand von Eichproteinen mit bekanntem Molekulargewicht bestimmen.

### **Zusammensetzung eines SDS-PAGE Gels:**

Die folgenden Angaben gelten für 6 kleine oder 1 großes Gel

|                        |                                                                                                                                                                        |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Trenngel 7,5 %</b>  | 7.5 ml Acrylamid-Stammlösung (30%)<br>7.5 ml Trenngelpuffer (siehe unten)<br>14.8 ml Aqua dest.<br>10 µl Tetramethyldiamin (Temed)<br>200 µl 10%iges Ammoniumpersulfat |
| <b>Sammelgel 3,9 %</b> | 1.95 ml Acrylamid-Stammlösung (30%)<br>3.75 ml Trenngelpuffer (siehe unten)<br>9.3 ml Aqua dest.<br>15 µl Temed<br>150 µl 10%iges Ammoniumpersulfat                    |
| <b>Trenngelpuffer</b>  | 1.5 M Tris/HCl<br>0.4% (w/v) SDS<br>pH 8.8                                                                                                                             |
| <b>Sammelgelpuffer</b> | 0.5 M Tris/HCl<br>0.4% (w/v) SDS<br>pH 6.8                                                                                                                             |

**Elektrophorese-**

|                   |                |
|-------------------|----------------|
| <b>Laufpuffer</b> | 23 mM Tris/HCl |
|                   | 190 mM Glycin  |
|                   | 0.2% (w/v) SDS |
|                   | pH ca. 8.3     |

**2.3.3.2 Herstellung von zweidimensionalen Gelen (2D-Gele)**

Mit zweidimensionalen Gelen ist es möglich, Proteine sowohl nach ihrem isoelektrischen Punkt (also ihrer Ladung) als auch ihrer Größe aufzutrennen. Dazu wird die Probe zunächst über Rundgele aufgetrennt, in welche Ampholyte mit unterschiedlichen pH- Werten eingegossen werden. Für die Rundgele werden spezielle Gießröhrchen benötigt. Diese wurden an der Unterseite mit Parafilm abgedichtet und das Ampholyt-Gel mit einer langen Pasteurpipette eingefüllt. Nach der Übersichtung mit H<sub>2</sub>O wurden die Rundgele oben ebenfalls mit Parafilm verschlossen und konnten über Nacht auspolymerisieren. Zum Gellauf wurden die Rundgele ein Stück aus dem Röhrchen gedrückt, um Platz für die Probe zu schaffen. Am unteren Ende wurden die Gele mit Gaze überzogen und diese mit einem Gummiring fixiert. Dann konnten sie in einem speziellen Aufsatz in die Gelkammer eingesetzt werden. Die Proben wurden in Lysis-Puffer A gelöst, auf das Gel aufgetragen, mit Lysis-Puffer K überschichtet und mit Kathodenpuffer aufgefüllt. Als Marker diente BSA oder Actin. Der untere Puffertank (Anode) wurde nun mit 10 mM Phosphorsäure gefüllt, der obere Puffertank mit Agarose abgedichtet und mit 20 mM Natronlauge gefüllt. Die Focussierung im Rundgel erfolgte bei steigender Stromspannung (200 V für 15 Minuten, 300 V für 30 Minuten und anschließend 400 V für 16-18 Stunden). Im Anschluß wurden die Gele aus den Röhrchen herausgedrückt und in O-Puffer für 15 Minuten äquilibriert. Die zweite Dimension erfolgte auf großen Gelen, die gemäß der Anleitung in 2.3.3.1 hergestellt worden waren. Die äquilibrierten Rundgele wurden auf ein Gel aufgelegt und mit Agarose, welche mit O-Puffer angesetzt wurde (0,5%ig, versetzt mit 0,01 % Bromphenolblau) eingebettet. Seitlich davon konnte noch ein Marker mitlaufen. Der Gellauf erfolgte, wie oben beschrieben, bis der blaue Farbstoff aus dem Gel ausgetreten war. Das Anfärben und Entfärben wurde wie in 2.3.4 beschrieben durchgeführt.

**Benötigte Lösungen:**

**Lysis-Puffer A**

- 9.5 M Harnstoff
- 6% Nonidet P 40
- 25 mM DTT
- 0.8 % Ampholine 4-6
- 0.8 % Ampholine 5-7
- 0.8 % Ampholine 3.5-10
- Lagerung bei -20 °C

**Lysis-Puffer K**

- 6 M Harnstoff
- 0.4 % Ampholine 4-6
- 0.4 % Ampholine 5-7
- 0.4 % Ampholine 3.5-10

**O-Puffer**

- 60 mM Tris
- 2 % SDS
- 10 % Glycerin
- 20 mM DTT pH 6.8

**2.3.4 Färbung der Gele mit Coomassie**

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue ist in der Lage, an Proteine zu binden. Schon Proteinmengen von etwa 0,5 µg können im SDS-Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden. Zur Färbung wurde das Gel nach der Elektrophorese zwischen einer Stunde bis über Nacht gefärbt und anschließend mit Entfärber die Hintergrundfärbung wieder entfernt.

**Färbelösung (1000 ml) :**

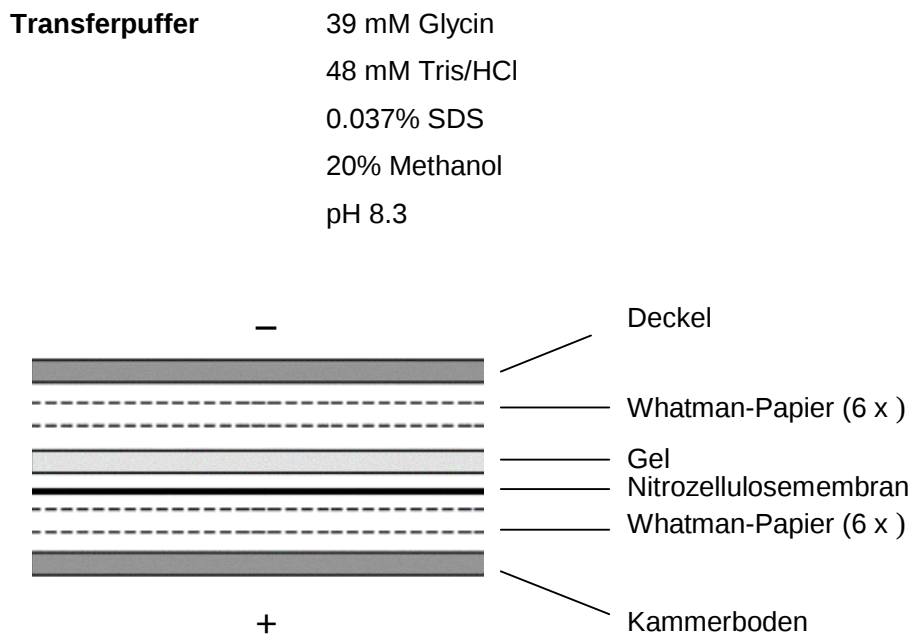
- 400 ml Methanol
- 125 ml Essigsäure
- auf 1000 ml mit Aqua dest. Auffüllen
- 2 g Coomassie Brilliant Blue R-250
- Die Gele wurden in 7,5% Essigsäure aufbewahrt.

**Entfärber (1000 ml) :**

- 200 ml Isopropanol
- 116 ml Essigsäure
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

## 2.4 „Semidry“ Western-Blot

Nachdem die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurden sie teilweise mit Hilfe des „semidry“ Western-Blots nach Kyhse-Andersen (1984) auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Bei dieser Methode wird eine Spannung angelegt, die Proteine wandern in Richtung der Anode und werden auf der Nitrocellulosemembran immobilisiert (Abb. 2.6). Das Blotting wurde bei 0,8 mV je cm<sup>2</sup> zwei Stunden lang durchgeführt. Danach wurden die gebundenen Proteine mit einer 1:10 verdünnten Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt. Hierzu wurden die Nitrocellulosemembranen nach dem Transfer für 1 bis 2 Minuten mit PonceauS-Lösung übergossen und anschließend überschüssige Färbelösung mit Aqua dest. abgewaschen.



**Abb. 2.6:** Aufbau eines „semidry“ Western-Blots

Von unten nach oben wurden zunächst mit Transfer-Puffer getränkte Whatman-Papiere luftblasenfrei übereinandergelegt, darauf die Nitrocellulosemembran, dann das SDS-Gel und wiederum Whatman-Papiere. Die Proteine, die eine negative Ladung tragen, wandern in Richtung Pluspol und werden in der Membran immobilisiert.

## 2.5 Sauerstoffbindungskinetik

Die Durchführung der Versuche zur Sauerstoffbindungskinetik erfolgte im Institut für Biophysik (Mainz). Die Sauerstoffbindungskurven wurden nach der fluorometrisch-polarographischen Methode von Loewe (1978) aufgenommen. Bei diesem Verfahren macht man sich den Umstand zunutze, dass deoxigeniertes Hämocyanin bei einer Wellenlänge von 280 nm fluoresziert. Mit steigendem Grad der Oxygenierung nimmt die Intensität der Fluoreszenz linear ab. Zur Durchführung wurde eine Hämocyaninlösung zunächst mit wasserdampfgesättigtem Sauerstoff vollständig oxigiert und im Anschluß durch Rühren unter wasserdampfgesättigtem Stickstoff langsam deoxigeniert. Währenddessen wurde der Sauerstoffpartialdruck mittels einer Clark-Elektrode gemessen. Die Hämocyaninlösung befand sich während der Versuchsdurchführung in einem Fluorimeter (Farrand, München), wo sie mit UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt wurde. Aus der Änderung der Fluoreszenz und der Messung des Sauerstoffpartialdruckes war es möglich, die Sauerstoffbindungskurve abzulesen und den Halbsättigungsdruck ( $p_{50}$ ), sowie nach Umrechnung in den Hill-Plot, den Hillkoeffizient ( $n_H$ ) zu bestimmen.

## 2.6 Mikrobiologische Methoden

### 2.6.1 Bakterienstämme und Vektoren

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

#### **Bakterienstämme :**

- *E. coli* XL 1 Blue MRF' (Stratagene, Heidelberg)
- *E. coli* XL0LR (Stratagene, Heidelberg)
- *E. coli* Top10 (Invitrogen, Groningen)
- *E. coli* M 15 [pREP4] (Qiagen, Hilden)

**Phagen :**

Zur Synthese sämtlicher cDNA-Banken wurde der ZAP Express Vektor, für die *in vivo*-Excision der ExAssist™ Helfer-Phage (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

**Plasmidvektoren :**

Es wurden folgende Vektoren zur Klonierung verwendet:

|                                         |                               |
|-----------------------------------------|-------------------------------|
| pBK-CMV (Stratagene, Heidelberg):       | ZAP Express™ cDNA-Banken      |
| PCR 4-TOPO® TA (Invitrogen, Groningen): | Klonierung von PCR-Fragmenten |
| PQE 30 (Qiagen, Hilden)                 | Expression von Proteinen      |

**Verwendete Nährmedien**

|                              |                                                                                                                       |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>LB-Medium (pro Liter)</b> | 10 g NaCl<br>10 g Trypton<br>5 g Hefeextrakt<br>pH 7.4                                                                |
| <b>LB-Agar</b>               | 20 g Agar-Agar auf 1 Liter LB- Medium                                                                                 |
| <b>NZY-Medium</b>            | 5 g NaCl<br>2 g MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O<br>5 g Hefeextrakt<br>10 g NZ-Amin (Casein-Hydrolysat)<br>pH 7.5 |
| <b>NZY-Agar</b>              | 15 g Agar-Agar auf 1 Liter NZY-Medium                                                                                 |
| <b>NZY-Topagar</b>           | 0,7% (w/v) Agarose in NZY-Medium                                                                                      |

Alle Nährmedien wurden direkt nach der Herstellung bei 121°C (1,0 bar) für 30 Minuten autoklaviert. Der Agar wurde anschließend auf ca. 55°C abgekühlt, gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotika versetzt und in Petrischalen gegossen.

Folgende Antibiotika wurden verwendet :

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

### **2.6.2 Glycerinkulturen**

Zur längeren Aufbewahrung von Bakterien wurden diese mit Glycerin versetzt und bei einer Temperatur von –70°C eingefroren. Hierzu wurden aus Flüssigkulturen 700 µl Bakteriensuspension mit 300 µl sterilem Glycerin vermischt. Solche Glycerinkulturen sind üblicherweise über einen Zeitraum von einigen Monaten bis zu mehreren Jahren haltbar.

### **2.6.3 Plattenkulturen**

Aus den Glycerinkulturen der Bakterien wurden z.T. Ausstriche auf Agarplatten hergestellt. Dazu wurden die Bakterien mittels eines autoklavierten Zahnstochers auf dem Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend konnten diese Platten für einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

### **2.6.4 Flüssigkulturen**

Zur Vermehrung von Bakterien wurden einzelne Kolonien von einer Agarplatte mit Hilfe eines Zahnstochers in ca. 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

### 2.6.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Plasmide müssen zur Vermehrung in Bakterien transformiert werden. Das gelingt nur, wenn diese Bakterien kompetent, d.h. in der Lage sind, die Plasmide aufzunehmen. Kompetente Top 10- Bakterien wurden mit den meisten Klonierungsvektoren mitgeliefert (z. B. PCR 4 TOPO ® TA von Invitrogen). Für die rekombinante Expression von Proteinen war es notwendig die kompetenten Bakterien selbst herzustellen. Dazu wurde LB-Medium mit dem Antibiotikum Kanamycin versetzt, mit M15 Bakterien beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Kultur wurden 100 µl abgenommen und zu einem Volumen von 100 ml LB-Medium mit 20 mM Glucose gegeben. Anschließend wurde der Ansatz so lange bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die OD<sub>600</sub>, die photometrisch bestimmt wurde, ungefähr bei 0,3 lag. Nach dem Abzentrifugieren bei 1000 x g für 15 Minuten wurden die Bakterien in 4 ml TSS aufgenommen, 30 Minuten auf Eis stehen lassen und der Vorgang wiederholt.

|                |                         |
|----------------|-------------------------|
| <b>1 x TSS</b> | 1 x LB Broth            |
|                | 10% (w/v) PEG 3350      |
|                | 5% DMSO                 |
|                | 40 mM MgSO <sub>4</sub> |
|                | pH 6.5                  |

### 2.6.6 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden 25 µl (Proteinexpression: 100 µl) kompetenter Bakterien mit den zu transformierenden Plasmiden (10 bis 100 ng zirkuläre Plasmid-DNA) gemischt und für 30 Minuten auf Eis gehalten. Nach kurzem Hitzeschock (30 Sekunden bei 42 °C) wurde dem Ansatz 250 µl SOC-Medium (Proteinexpression: 900 µl LB-Medium mit Glucose) zugegeben und die Bakterien bei 37°C zur Erholung mindestens 1,5 Std. inkubiert. Danach wurden die transformierten Bakterien auf LB-Platten ausplattiert, die zur Selektion plasmidtragender Klone mit den entsprechenden Antibiotika versetzt worden waren, und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

## 2.7 Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 Fällung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren zu präzipitieren, wurde die Probe mit einem Zehntel Volumen einer Lösung einwertiger Kationen (10 M Ammoniumacetat, 8 M Lithiumchlorid, 2 M Natriumchlorid oder 3 M Natriumacetat) und 2,5 Volumen Ethanol p.a., oder einem Volumen Isopropanol p.a., gemischt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für 60 Minuten oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht gefällt. Anschließend wurde das gewonnene Präzipitat bei  $12000 \times g$  60 Minuten lang zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, wiederum 5 Minuten zentrifugiert, und danach bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefällten Nukleinsäuren konnten dann in Aqua bidest gelöst werden.

### 2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Konzentration hat man die Möglichkeit, eine photooptische Messung durchzuführen. Nukleinsäuren zeigen bei 260 nm ein Absorptionsmaximum. Die Messungen wurden mit Küvetten einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Für die Konzentrationsbestimmung gilt:

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

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

Durch die Bestimmung des Quotienten aus  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  ist es möglich, näherungsweise die Reinheit der RNA- bzw. DNA hinsichtlich einer Verunreinigung mit Proteinen zu bestimmen.

Hierfür gilt:

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

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

Alternativ wurde der sogenannte „Dot“-Test durchgeführt, bei dem man 0.5 bis 1  $\mu\text{l}$  DNA auf eine 1%ige, mit Ethidiumbromid versetzte Agaroseplatte aufgetragen und die DNA-Menge durch Vergleich mit einem bekannten Standard abgeschätzt.

### **2.7.3 Präparation von Plasmid-DNA**

Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim und Doly, 1979) mit anschließender Präzipitation der bakteriellen Proteine mit Hilfe des E.Z.N.A Miniprep Kits der Firma Peqlab (Erlangen) durchgeführt. Hierzu wurden die Bakterien aus der Übernachtskultur zunächst abzentrifugiert, lysiert, die Reaktion neutralisiert und dann die Bakterentrümmer präzipitiert. Diese Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der klare Überstand über eine Säule mit einer Silikamatrix, welche die DNA bindet, gegeben. Nach mehrmaligem Waschen und anschließendem Trocknen der Membran wurde die DNA mit etwa 50 µl Elutionspuffer (10 mM Tris, pH 8.5) eluiert.

### **2.7.4 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen**

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

#### **Standardansatz zum Restriktionsverdau:**

200 ng bis 1 µg Plasmid DNA

1 bis 5 Einheiten (Units) Enzym

(1 Unit schneidet 1 µg DNA/h unter optimalen Bedingungen)

Reaktionspuffer

mit H<sub>2</sub>O auffüllen bis zum erwünschten Endvolumen (i.d.R. 10 µl).

### **2.7.5 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden**

Nach einer Digoxigenin(Dig)markierung konnten bereits vorhandene DNA-Fragmente als Sonden für das Screening von cDNA-Banken benutzt werden. Zur Herstellung der Sonden wurde eine PCR mit Dig-markierten dNTPs durchgeführt. Dazu wurde ein Fragment mit

spezifischen Primern amplifiziert, anstelle von Standardnukleotiden aber ein Nukleotidmix verwendet, der Dig-markierte dUTPs enthielt.

## **2.7.6 Gelelektrophorese**

### **2.7.6.1 DNA-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel von 1-2% entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente dabei 0,5 x TBE. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 6 V/cm Elektrodenabstand. Das Ethidiumbromid (5 µl einer 1%igen Stammlösung auf 100 ml) interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Strahlung. Als Molekulargewichtsstandard wurde entweder mit EcoRI und HindIII geschnittene λ-Phagen-DNA, oder eine 100 bp Leiter aufgetragen.

#### **Verwendeter Puffer:**

|                 |                |
|-----------------|----------------|
| <b>10 x TBE</b> | 0,9 M Tris/HCl |
|                 | 0,9 M Borsäure |
|                 | 20 mM EDTA     |
|                 | pH 8.3         |

### **2.7.6.2 RNA-Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in 1%igen Agarosegelen, die mit Formaldehyd versetzt wurden, welches die RNA denaturiert und die Aktivität von RNAsen verhindern soll.

#### **Ansatz für ein horizontales Gel:**

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

|                             |                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>10 x MOPS-Puffer</b>     | 0.2 M MOPS, pH 7<br>0.05 M NaAcetat, pH 7<br>0.1 M EDTA, pH 8                                                                                                           |
| <b>10 x Beladungspuffer</b> | 100 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)<br>720 µl Formamid<br>260 µl Formaldehyd<br>100 µl steriles Wasser<br>50% steriles Glyzerin<br>0.4% Bromphenolblau<br>0.4% Xylencyanol |

Die RNA-Proben wurden in einem Volumen von 5-10 µl mit 5 µl des Beladungspuffers bei 70°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Das Ergebnis wurde auch hier unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### **2.7.7 DNA-Isolierung aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde mit Systemen verschiedener Hersteller durchgeführt, die alle auf dem Prinzip der reversiblen Bindung von DNA an eine Silikamatrix beruhen. Nach der Bindung und Reinigung ließ sich die DNA unter leicht alkalischen Bedingungen (etwa pH 8) wieder aus der Membran eluieren. Die Extraktion erfolgte nach Angaben des jeweiligen Herstellers.

#### **Folgende Kits wurden verwendet :**

Qiagen (Hilden)  
Machery & Nagel (Düren)  
Eppendorf (Wesseling)

## 2.8 Präparation von RNA

Je nach Tierart wurden unterschiedliche Gewebe oder ganze Tiere für die RNA-Präparation verwendet. Zunächst wurden die Tiere zur Immobilisierung 1 bis 2 h auf Eis gekühlt. Die Tiere wurden entweder mittels Dekapitation, Durchtrennen des Hauptnervenstranges oder direktes Einbringen in flüssigen Stickstoff (bei kleinen Tieren) getötet. Während der gesamten Präparation wurde auf Eis gearbeitet um die RNA vor Degradation durch RNAsen zu schützen. Darüber hinaus wurden alle verwendeten Materialien vor der Benutzung autoklaviert. Im Anschluß an die Präparation wurde sowohl eine photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und ihrer Reinheit durchgeführt (siehe 2.7.2) als auch eine elektrophoretische Auftrennung auf einem RNA-Gel zusammen mit einer Standard RNA (siehe 2.7.6.2). Beides diente der Überprüfung der RNA-Qualität.

### 2.8.1 RNA-Präparation nach der GTC-Methode

Um größere Mengen an Gewebe zu präparieren, wurde dieses entweder mittels Mörser und Pistill unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff homogenisiert und in 10 bis 20 ml GTC-Puffer überführt, oder direkt in den Puffer gegeben und mit Hilfe eines Ultraturaxgerätes (Janke & Kunkel, Staufen i. Breisgau) zerkleinert. Anschließend wurden 1 ml 2M Natriumacetat, 10 ml Phenol und 10 ml CIA (Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1) zugegeben und die RNA für 15 Minuten auf Eis gekühlt. Die Probe wurde dann 60 Minuten bei 4°C und 6000 rpm zentrifugiert, danach die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und mit einem Volumen Isopropanol p.a. gemischt. Es folgte eine Präzipitation bei -20°C über Nacht. Anschließend wurde ein weiteres Mal wie oben beschrieben zentrifugiert und das entstandene Pellet in etwa 10 ml GTC-Puffer gelöst. Die Präzipitation mit einem Volumen Isopropanol wurde wiederholt und das Pellet nach erneuter Zentrifugation mit 80% Ethanol gewaschen. Nach Trocknung bei Raumtemperatur konnte das Pellet in 5 bis 10 ml Aqua bidest gelöst werden (z.T. war es notwendig, die RNA für 20-30 Minuten bei 50°C zu schütteln). Die Probe wurde durch Zentrifugation wiederum pelletiert. Die RNA befand sich danach im Überstand.

**Verwendete Lösungen :**

**GTC-Puffer**                    100 g Guanidinthiocyanat in 117 ml H<sub>2</sub>O bidest lösen  
                                      7.0 ml 0.75 M Natriumcitrat, pH 7.0  
                                      10.6 ml 10% Sarcosyl  
                                      1.52 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol

2 M Natriumacetat, pH 4.0  
wässrige Phenollösung  
Chloroform-Isoamylalkohol 49:1  
Isopropanol p.a.  
80% Ethanol  
H<sub>2</sub>O bidest (mit DEPC behandelt)

**2.8.2     Präparation von poly-(A)<sup>+</sup>-RNA**

Die Isolation der mRNA (messenger RNA) erfolgte mit dem Poly(A)<sup>+</sup>Tract mRNA Isolation System I der Firma Promega (Mannheim). Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass die meisten eukaryotischen mRNA-Moleküle im Gegensatz zu den anderen RNAs an ihrem 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal tragen, welches aus bis zu 250 Adenosin-Nukleotiden besteht. Mit Hilfe dieses poly-(A)<sup>+</sup>-Schwanzes lässt sich mRNA, die einen Anteil von etwa 5% an der Gesamt-RNA hat, von allen anderen RNA-Arten trennen. Die Poly(A)<sup>+</sup>Tract-Präparationsmethode verwendet ein oligo(dT) Oligonukleotid, das an seinem 5'-Ende biotinyliert ist. Dieses Biotin-oligo(dT) Oligonukleotid hybridisiert mit dem poly-(A)<sup>+</sup>-Schwanz der mRNA. Mit Hilfe von Streptavidin, welches an magnetische Partikel gebunden ist und ganz spezifisch an Biotin bindet, lassen sich die poly-(A)<sup>+</sup>-RNA-Biotin-oligo(dT)-Moleküle in einem magnetischen Feld von anderen RNAs trennen und mit Wasser eluieren. Die paramagnetischen Partikel verbleiben mit dem Streptavidin und den biotinylierten Oligo (dT) als Komplex in der festen Phase, die mRNA liegt in der wässrigen Phase vor.

## 2.9 Synthese von cDNA-Banken

Die gesamte Information der mRNA bestimmter Organismen oder Gewebe kann in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und dann vervielfältigt werden. Hierzu wird sehr instabile RNA zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend in einen selbstreplizierenden  $\lambda$ -Vektor kloniert. Die so entstandenen cDNA-Expressionsbanken können mit Hilfe von Antikörpern oder spezifischen Sonden auf bestimmte genetische Informationen durchsucht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden cDNA-Banken von unterschiedlichen Organismen angefertigt. Die Herstellung erfolgte mit dem ZAP Express™ cDNA Synthese Kit der Firma Stratagene (Heidelberg) nach der beiliegenden Anleitung.

### 2.9.1 Erststrangsynthese

Im ersten Schritt wurden mittels der reversen Transkriptase zwischen 1 und 5  $\mu$ g poly-(A)<sup>+</sup>-RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Zu diesem Zweck mußten die Sekundärstrukturen der RNA bei 70°C denaturiert werden. Außerdem war es wesentlich, bei allen Arbeiten mit RNA darauf zu achten, dass sie nicht von RNAsen zerstört wurden, weshalb mit RNase-freien Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen gearbeitet wurde. Für die Erststrangsynthese wurde ein Linkerprimer eingesetzt, der an seinem 5'-Ende einmal die zum poly-A<sup>+</sup>-Schwanz komplementäre oligo(dT)-Sequenz und zusätzlich die Schnittstelle für das Restriktionsenzym XhoI besitzt. Dadurch wurde ein gerichtetes Klonieren der cDNA in die ZAP Express-Vektorarme beziehungsweise des LacZ Promotors ermöglicht. Durch den Einsatz methylierter Nukleotide verfügt die Erststrang-cDNA über eine Methylgruppe an jedem Cytosin, die einen unerwünschten Verdau an weiteren XhoI-Schnittstellen verhindert. Als reverse Transkriptase diente hierbei die SuperScript™ Reverse Transkriptase.

### 2.9.2 Zweitstrangsynthese

Die Zweitstrangsynthese erfolgte mit Hilfe des Enzyms DNA Polymerase I, welches für seine Reaktion solche Primer benötigt, an denen der zweite Strang komplementär zum ersten cDNA-Strang synthetisiert werden kann. Dazu dienten hier Reste der RNA, die nach Behandlung der RNA-DNA-Hybride mit dem Enzym RNaseH erhalten blieben. Da-

durch konnte doppelsträngige cDNA synthetisiert werden, in die nicht-methyliertes dCTP eingebaut wurde, um einen späteren Restriktionsverdau der cDNA mit XhoI zu ermöglichen. Danach wurden die Enden der cDNA-Moleküle mit Hilfe der Pfu-DNA Polymerase aufgefüllt (blunt end) und nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion an EcoRI-Adaptoren ligiert. Nach folgender Phosphorylierung und einem Restriktionsverdau mit XhoI besitzen die cDNA-Moleküle an beiden Seiten kohäsive Enden, die jetzt gerichtet in die Vektorarme einkloniert werden konnten.

### 2.9.3 Größenfraktionierung

Um die cDNA-Moleküle nach ihrer Länge zu trennen, wurde eine Größenfraktionierung über eine Sephacryl- S-500-Säule durchgeführt. Dabei wurde die cDNA auf die Säulenmatrix aufgebracht und bei 400 x g zentrifugiert. Große Fragmente laufen dabei schneller durch die Säule als kleine. Die Fraktionen wurden einzeln gesammelt und eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung durchgeführt. Die Fraktion(en), welche die größten Fragmente enthielt(en), wurde(n) weiterverarbeitet.

### 2.9.4 Ligation in die Vektorarme und Verpackung

Es wurden bis zu 500 ng der cDNA in die Vektorarme ligiert. Dabei erfolgte die Ligation meist für zwei Tage bei 6°C im Kühlraum. Für die Verpackung des Vektors wurden 1 bis 4 µl dieses Ligationsansatzes mit dem Verpackungskit Gigapack III Gold der Firma Stratagene (Heidelberg) für genau 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um eine stabilisierende Hülle zu erhalten. Auch hier wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Das Ergebnis dieser Prozedur war eine „primäre cDNA-Bank“, deren Titer in einer Verdünnungsreihe bestimmt werden konnte. Dazu wurden die Phagen in SM-Puffer verdünnt und mit Bakterien des *E. coli*-Stammes XL-1 Blue MRF' bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, um eine Infektion der Bakterien durch die Phagen zu ermöglichen. Danach wurden sie zusammen mit NZY-Topagar auf NZY-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank für 6 bis 8 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit hatten die Phagen so viele Bakterien lysiert, dass Plaques im Bakterienrasen sichtbar waren, die ausgezählt werden konnten. Einheit hierfür sind pfu (plaque forming units). Der Primärtiter bewegte sich bei den im Rahmen dieser Arbeit erstellten cDNA-Banken zwischen 80 und 500 pfu/µl.

|                  |                                              |
|------------------|----------------------------------------------|
| <b>SM-Puffer</b> | 0.1 M NaCl                                   |
|                  | 10 mM MgCl <sub>2</sub> x 7 H <sub>2</sub> O |
|                  | 50 mM Tris/Hcl                               |
|                  | 0.01% (w/v) Gelatine                         |
|                  | pH 7.5                                       |

### 2.9.5 Amplifikation der cDNA-Bank

Die gesamte Primärbank wurde so auf NZY-Agarplatten verteilt, dass jede Platte 50 000 pfu enthielt. Die Agarplatten wurden anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert und die Phagen dann mit SM-Puffer eluiert. Auch hier wurde der Titer der amplifizierten Bank in einer Verdünnungsreihe ermittelt.

**Tabelle 2.1: Im Rahmen der Arbeit erstellte cDNA-Banken:**

| Organismus                            | Gewebe                           | verwendeter Vektor |
|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| <i>Archispirostreptus gigas (Agi)</i> | vollständige Tiere ohne Cuticula | ZAP Express™       |
| <i>Thermobia domestica (Tdo)</i>      | vollständige Tiere               | ZAP Express™       |
| <i>Perla marginata (Pma)</i>          | vollständige Tiere               | ZAP Express™       |
| <i>Limulus polyphemus (Lpo)</i>       | Innere Organe                    | ZAP Express™       |

## 2.10 Screening von cDNA-Banken

### 2.10.1 Antikörperscreening

Mit dem ZAP Express™-Vektor ist es möglich die ligierte cDNA problemlos in XL-1 Blue Bakterien zu exprimieren. Durch Zugabe eines  $\beta$ -Galaktosids (Isopropylthiogalactoside, IPTG) kann die Synthese der gewünschten Proteine induziert werden, da der lacZ-Promotor vor der Klonierungsstelle im Vektor lokalisiert ist. Für das Screening standen verschiedene Antikörper zur Verfügung (siehe 7.7 im Anhang). Ein Antikörper gegen das Hämocyanin der Steinfliege wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt (siehe 2.14). Das Antikörperscreening stellt eine abgewandelte Methode der Immunoscreening-Methode nach Sambrook et al. (1989) dar. Zur Durchführung wurden ca. 50 000 pfu der amplifizierten cDNA-Bank zusammen mit NZY-Topagar auf NZY-Agarplatten ausplattiert und so lange bei 42°C inkubiert, bis die ersten Plaques im Bakterienrasen sichtbar wurden. Anschließend konnten Nitrocellulosemembranen (Macherey & Nagel, Düren) aufgelegt werden, die zuvor mit 10 mM IPTG getränkt wurden. Die Platten wurden nun über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Filter zunächst markiert, um eine spätere Zuordnung zu gewährleisten, dann zog man sie von den Platten ab, um sie kurz in 1 x TBST zu waschen. Danach wurden sie mehrere Stunden lang in 5% Trockenmilchpulver/TBST abgesättigt, um unspezifische Bindungen zu verhindern, und anschließend mit dem entsprechenden Primärantikörper in 5% Milch/TBST über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der primäre Antikörper wurde durch 3x10-minütiges Waschen mit TBST entfernt und die Filter dann für 1 Stunde mit einem entsprechenden sekundären Antikörper (Verdünnung 1:10000) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x10 Minuten) konnten die positiven Klone mit Hilfe einer Farbreaktion detektiert werden. Da die Anti-Hämocyanin-Antikörper in Kaninchen oder Meerschweinchen hergestellt worden waren, konnten in Ziegen hergestellte Sekundärantikörper Anti-Kaninchen (Alkaline Phosphatase conjugated AffiniPur Goat Anti Rabbit IgG (H+L)) bzw. Anti-Meerschweinchen (Alkaline Phosphatase conjugated AffiniPur Goat Anti guinea-pig IgG (H+L)) mit ihnen reagieren. Diese sekundären Antikörper wiederum lagen mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt vor, so dass ein Nachweis mittels NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat) möglich war. Für 10 ml Entwicklungspuffer wurden 33  $\mu$ l BCIP- und 66  $\mu$ l NBT-Stammlösung verwendet. Der alkalischen Phosphatase dient BCIP als Substrat, durch dessen Oxidation ein blauviolettcs Präzipitat entsteht. Gleichzeitig wird das NBT reduziert, was ebenfalls zu einem blauen

Präzipitat führt. Die Farbreaktion kann durch Zugabe von H<sub>2</sub>O dest. gestoppt werden. Die positiven Klone wurden aus dem Agar ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer mit 20 µl Chloroform bei 4°C aufbewahrt. Das Screening wurde so lange wiederholt, bis Einzelplaques isoliert werden konnten.

#### Verwendete Lösungen:

|                           |                                                                          |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| <b>10 x TBS</b>           | 100 mM Tris/HCl<br>1.5 M NaCl<br>pH 7.5                                  |
| <b>1 x TBST (1000 ml)</b> | 100 ml 10 x TBS<br>3 ml Tween-20<br>auf 1000 ml mit Aqua dest. Auffüllen |
| <b>Entwicklungspuffer</b> | 100 mM Tris/HCl<br>100 mM NaCl<br>5 mM MgCl<br>pH 9.5                    |
| <b>NBT-Stammlösung</b>    | 50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid                                     |
| <b>BCIP-Stammlösung</b>   | 50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid                                   |

#### 2.10.2 Sondenscreening

Der Nachweis von Klonen mit einer gewünschten Sequenz über DNA-Sonden ist sehr viel spezifischer als der über Antikörper. Allerdings benötigt man für die Herstellung einer DNA-Sonde ein Teilstück der entsprechenden Sequenz. Aus diesem Grund ist das Sondenscreening eine wirkungsvolle Methode, solche Klone zu finden oder zu vervollständigen, von denen schon Teilsequenzen vorliegen (zur Herstellung von DNA-Sonden siehe 2.7.5). Für das Sondenscreening wurden cDNA-Banken auf gleiche Art und Weise wie beim Antikörperscreening auf NZY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden für 60 min bei 4°C abgekühlt. Um die Phagen-DNA auf eine Ny-

Ionmembran zu transferieren, wurde diese für 1-2 Minuten auf die Platten aufgelegt. Danach wurden die Filter für 10 Minuten mit der Plaquesseite nach oben auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Whatman-Papier gelegt, um die doppelsträngige DNA zu denaturieren. In zwei folgenden Schritten wurden die Filter auf die gleiche Weise zuerst neutralisiert und dann äquilibriert. Anschließend wurde die DNA im Trockenschrank bei 80°C auf der Membran fixiert. Im Anschluß daran wurden die unspezifischen Bindungsstellen zunächst durch eine 60 -minütige Inkubation in einer Hybridisierungslösung, der noch keine Sonde zugesetzt war, bei 68°C abgesättigt. Die Hybridisierung selbst erfolgte in 30 ml Hybridisierungslösung, die etwa 5 ng der DNA-Sonde enthielt, über Nacht bei 68°C. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zuerst bei Raumtemperatur 2 x 5 Minuten mit Waschpuffer 1 und anschließend für 2 x 15 Minuten bei 68°C mit Waschpuffer 2 gewaschen. Dann wurden die Filter 30 Minuten lang in Blockierungslösung geschüttelt und anschließend in Blockierungspuffer mit dem sekundären anti-Fab-Fragment, das ebenfalls mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt vorliegt, für weitere 30 Minuten inkubiert (Verdünnung 1:10000). Danach konnten die Filter mit Waschpuffer 3 für 3 x 5 Minuten gewaschen, die Farbnachweisreaktion mit NBT/BCIP sowie die Isolation der positiven Klone wie beschrieben (siehe 2.10.1) durchgeführt werden.

**Verwendete Lösungen:**

|                               |                                      |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| <b>20 x SSC</b>               | 3 M NaCl<br>300 mM Citrat<br>pH 7.0  |
| <b>Denaturierungslösung</b>   | 0.5 M NaOH<br>1.5 M NaCl             |
| <b>Neutralisierungslösung</b> | 1 M Tris/HCl<br>1.5 M NaCl<br>pH 7.5 |

|                              |                                                                                                                |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Hybridisierungslösung</b> | 0.1% Natrium-N- Laurylsarcosinat<br>1% Blockingreagenz (Boehringer, Mannheim)<br>0.02% SDS<br>lösen in 5 x SSC |
| <b>Waschpuffer 1</b>         | 0.1% SDS<br>lösen in 2 x SSC                                                                                   |
| <b>Waschpuffer 2</b>         | 0.1% SDS<br>lösen in 0.5 x SSC (aus 20 x SSC hergestellt)                                                      |
| <b>Waschpuffer 3</b>         | 150 mM NaCl<br>100 mM Tris<br>pH 7.5                                                                           |
| <b>Blockierungspuffer</b>    | 100 mM Tris<br>150 mM NaCl<br>1% Blockingreagenz (Boehringer, Mannheim)<br>pH 7.5                              |

### 2.10.3 *In vivo*-Excision

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

zum  $\lambda$ -Vektor gehören, ausserhalb des Initiations- bzw. Terminationssignals liegen und nicht zirkularisiert werden. Das entstandene Phagemid wird jetzt noch in eine Phagenhülle verpackt und sezerniert. Anschließend infiziert man *E. coli* des Stammes XL0LR mit dem Phagemid und kann diese auf Agarplatten ausplattieren, die mit selektiven Antibiotika versetzt worden sind. Die *in vivo*-Excision erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

## 2.11 PCR-Techniken

Mit der “polymerase chain reaction” (PCR) ist es möglich ein spezifisches DNA-Fragment zu amplifizieren, also zu vermehren. Voraussetzung sind zwei Primer, welche an die gewünschte Sequenz binden. Zur Amplifikation benutzt man temperaturstabile DNA-Polymerasen, die den wiederholten DNA-Synthese- und Renaturierungszyklen der neusynthetisierten DNA-Doppelstränge standhalten. Zunächst wird in einer Hybridisierungsreaktion der erste Primer an den gewünschten DNA-Strang im vorgesehenen 5'-Terminus gebunden. Dann wird mit Hilfe einer Polymerase (Taq-Polymerase oder Pfu-Polymerase) ein DNA-Strang in Richtung auf das 3'-Ende gebildet. Nach thermischer Denaturierung kann der neugebildete DNA-Strang mit einem zweiten Oligonukleotidprimer hybridisieren, der zum neusynthetisierten DNA-Strang komplementär ist. Dieser Zyklus wird bis zu 40mal wiederholt. Typischerweise findet die Denaturierung der DNA bei 94°C statt. Die Anlagerungsreaktion an die DNA (Annealing) erfolgt abhängig von Template und verwendetem Primer meist bei Temperaturen zwischen 50°C und 65°C, während die Verlängerungsreaktion (Elongation) bei 72°C abläuft. Zu Beginn einer PCR wird die DNA zunächst bei 94°C für 3 bis 4 Minuten denaturiert und zum Abschluß nochmals für 8 bis 10 Minuten elongiert, um der Polymerase die Möglichkeit zu geben, alle amplifizierten Stränge zu vervollständigen. Die Taq-Polymerase hängt charakteristisch ein einzelnes, überhängendes Adenosinnukleosidtriphosphat an das 3'-Ende der DNA, was nachfolgend für die Klonierung genutzt werden kann. Die Standard-PCR wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit vor allem benutzt, um Klone aus einer vorhandenen cDNA-Bank herauszuamplifizieren oder eine nested PCR nach erfolgter RT-PCR (siehe 2.11.2.1) durchzuführen.

### Standard-PCR-Ansatz

5 µl 10 x PCR-Puffer

1 µl dNTP-Mix

1 µl "upstream" Primer

1 µl "downstream" Primer

1 µl DNA-Template

0.5 µl Taq-Polymerase

ad 50 µl mit Aqua bidest auffüllen

### **2.11.1 Primerdesign**

Bei den Primern handelte es sich üblicherweise um solche, die spezifisch an die bereits vorhandenen Sequenzen binden. Diese wurden vor allem zur Amplifikation von fehlenden 5' bzw. 3' Enden eingesetzt. Teilweise war es allerdings auch nötig, degenerierte Primer einzusetzen, also solche, bei denen einige Basen nicht festgelegt sind. Sie wurden aus konservierten Bereichen bereits bekannter Sequenzen gesucht und verwendet, um verwandte Sequenzen bei anderen Tieren zu suchen. Die Primer wurden nach den üblichen Kriterien gewählt (Schmelzpunkte zwischen 55°C und 65°C, 20-25 bp Länge, keine Selbstbindung und keine Bildung von Haarschleifen) und mit einem Primerkalkulationsprogramm (Oligonucleotide Properties Calculator:

<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>) überprüft.

### **2.11.2 PCR-Methoden auf RNA**

#### **2.11.2.1 One-Step-RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion)**

Die RT-PCR wurde fast ausschließlich mit Hilfe des OneStep-PCR-Kits von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode beruht auf der Möglichkeit, die RNA in einem Schritt in cDNA umzuschreiben und diese mit spezifischen Primern zu vermehren. Die RNA wurde zunächst mit Hilfe der im Kit enthaltenen Reversen Transkriptase bei 42°C für 30 Minuten in cDNA umgeschrieben, danach wurde das Enzym für 15 Minuten bei 95°C inaktiviert. Im gleichen Ansatz erfolgte im Anschluß die PCR mit dem gewünsch-

ten Temperaturprofil. Auch die hierfür benötigte DNA-Polymerase I ist bereits im Enzym-Mix vorhanden.

**Standard one-step- RT-PCR-Ansatz:**

10 µl 5 x RT-Puffer  
3 µl dNTP's  
3 µl Primer 1 (10 pmol)  
3 µl Primer 2 (10 pmol)  
2 µl Enzym-Mix  
1 µl RNase-Inhibitor  
x µl Template  
ad 50 µl mit Aqua bidest auffüllen

**2.11.2.2 5'-RACE (Rapid Amplifikation of cDNA Ends)**

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

**2.12 Klonierung von PCR-Fragmenten**

Um ein PCR-Fragment in einen Plasmidvektor zu ligieren, wurde es nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel ausgeschnitten und eine Gelextraktion (siehe 2.7.7) durchgeführt. Zur Klonierung wurde der PCR 4 TOPO® TA-Vektor verwendet. Es

handelt sich bei diesem Klonierungsvektor um einen sogenannten TA-Vektor, was bedeutet, dass er am 5'-Ende ein dTTP-Nukleosidtriphosphat trägt und die Inserts über ein überhängendes Adenosinnukleosidtriphosphat ligiert werden. Zur Amplifikation kann hierbei ausschließlich eine Taq-Polymerase verwendet werden, da diese ein Adenosinnukleosidtriphosphat an das 3'-Ende anhängt. Das Prinzip des TOPO-Vektors ist eine Topoisomerisierung. Hierbei wird das PCR-Fragment mit Hilfe des Enzyms Topoisomerase I einkloniert. Es bindet an bestimmten Stellen an die doppelsträngige DNA und schneidet das Phosphodiester-Rückgrat in einem der Stränge auf. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des geschnittenen Stranges und einem Tyrosylrest der Topoisomerase konserviert. Die Bindung zwischen der DNA und dem Enzym wird dann vom 5'-Hydroxylrest des Originalstranges angegriffen und die reversible Bindung der Topoisomerase gelöst. Der Vektor ist somit aktiviert und kann das PCR-Produkt aufnehmen. Die TOPO-Klonierungsreaktion kann danach in mitgelieferte kompetente Bakterien TOP10 des Stammes *E. coli* transformiert werden.

### **2.13 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit „Big dye“ und einem entsprechenden Puffer der Firma Genterprise (Mainz). Von dieser Firma wurde auch der anschließende Gellauf durchgeführt, die Proben konnten mit dem Programm „Chromas“ (Version 1.55, Technelysum) editiert werden.

### **2.14 Expression von Proteinen**

Zur Herstellung eines spezifischen polyklonalen Antikörpers ist es notwendig, einem antikörperproduzierenden Tier (meist Kaninchen) das zu erkennende Antigen zu injizieren. Dazu braucht man größere Mengen des gereinigten Proteins, welches in Bakterien rekombinant exprimiert werden und dann aufgereinigt werden kann. Klonierung, Expression und Aufreinigung erfolgten mit einem Kit der Firma Qiagen. Um einen Antikörper gegen das Hämocyanin der Steinfliege herzustellen, wurde zunächst ein entsprechendes, etwa 1000 bp großes cDNA-Fragment in den pQE-30 Vektor ligiert. Dabei mußte auf den richtigen Leserahmen geachtet werden, um die Expression zu gewährleisten. Der Vektor mit

Insert wurde anschließend in kompetente Bakterien transformiert. Er trägt ein LacZ-Gen, hierdurch kann die Expression des gewünschten Proteins durch IPTG (Isopropyl-D-thiogalactopyranoside) induziert werden. Der pQE-Vektor trägt außerdem einen sogenannten His-Tag (6 Histidine hintereinander), über den nun das spezifische Protein mittels Nickel-Agarose (entweder über eine Säule oder im sogenannten „Batch-Verfahren“) gebunden wird. Durch anschließendes Absenken des pH-Wertes kommt es zu einer Protonierung des Histidins und der Ablösung des Proteins von der Nickel Agarose.

Zunächst wurden Testexpressionen durchgeführt um den Bakterienklon zu finden, der das gewünschte rekombinante Protein enthält. Dieser wurde anschließend in großen Mengen vermehrt, das Protein isoliert und auf einem SDS-Gel auf seine Reinheit untersucht. Das rekombinante Protein wurde an das Labor Charles River (Berlin) geschickt, wo die Herstellung des Antikörpers in einem Kaninchen erfolgte.

## **2.15 Molekulare Sequenzanalyse**

Die Sequenzdaten wurden mit verschiedenen Computerprogrammen bearbeitet, die in Tabelle 2.2 aufgelistet sind. Die im Rahmen der Arbeit gefundenen Sequenzen wurden zunächst in „Chromas“ editiert. Dann wurden sie mit Hilfe des „BLAST“ Suchalgorithmus mit bereits vorhandenen Sequenzdaten in verschiedenen Datenbanken (z.B. NCBI) verglichen. Gewünschte Sequenzen wurden dann in „GeneDoc“ eingefügt, dort konnten manuell Vergleiche („Alignments“) erstellt werden. Mit den Programmen des Programmpaketes „ExPasy Tool“ war es möglich, die Molekülmassen und isoelektrischen Punkte von Aminosäuren zu ermitteln, sofern die Sequenzen komplett vorlagen.

**Tabelle 2.2: Zur Sequenzauswertung verwendete Programme:**

| Computerprogramm | Internetadresse                                                                                                         |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Chromas 1.55     | <a href="http://www.technelysum.com.au/chromas.html">http://www.technelysum.com.au/chromas.html</a>                     |
| ExPASy Tool      | <a href="http://us.expasy.org/tools/">http://us.expasy.org/tools/</a>                                                   |
| Blast Japan      | <a href="http://www.blast.genome.ap.jp/">http://www.blast.genome.ap.jp/</a>                                             |
| Blast NCBI       | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>                                     |
| ClustalX 1.81    | <a href="ftp://ftg-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/">ftp://ftg-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/</a>                     |
| GeneDoc 2.6      | <a href="http://www.psc.edu/biomed/genedoc/">http://www.psc.edu/biomed/genedoc/</a>                                     |
| PHYLIP 3.6       | <a href="http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html">http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html</a> |
| Treeview 1.6     | <a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>   |

## 2.16 Molekulare Phylogenie

Bei der Erstellung von Stammbäumen kann man auf Distanzmatrix- und charakterorientierte Methoden zurückgreifen. Für diese Arbeit wurden die Neighbor-joining-Methode (Saitou und Nei, 1987) sowie die Bayes'sche Analyse (Huelsenbeck et al., 2002) angewandt. Die erste ist eine Distanzmatrix-orientierte Methode, bei der zweiten handelt es sich um eine charakterorientierte Methode, bei der aus Maximum-likelihood-Werten (Felsenstein, 1973, 1981) Wahrscheinlichkeiten berechnet werden können. Distanzmatrix-orientierte Methoden verwenden unterschiedliche Arten der Distanzmatrix-Berechnung (z.B. PAM, die in dieser Arbeit verwendet wurde ;Dayhoff, 1978; JTT usw.). Hierbei wird die durchschnittliche Austauschrate jeder Aminosäure der Sequenzen berechnet und so eine „Entfernung“ der Sequenzen voneinander ermittelt. Bei charakterorientierten Methoden werden Nukleotide und Aminosäuren als diskrete, diskontinuierliche Charaktere behandelt. Der phylogenetische Stammbaum wird anhand des Musters der Änderungen der Charaktere berechnet.

Zur Berechnung der Sicherheit einer Verzweigung innerhalb des Stammbaums wurde das Alignment bei der Neighbor-joining-Methode einem sogenannten „Bootstrapping“ unterzogen (Felsenstein, 1985). Es handelt sich hierbei um eine statistische Methode, bei der einzelne Positionen nach dem Zufallsprinzip innerhalb des Alignments dupliziert und andere deletiert werden, wobei die Gesamtlänge jedoch erhalten bleibt. Dadurch wird jede Position anders gewichtet, da manche Positionen mehrfach und andere gar nicht ausgewählt werden. Es wurden 100 Datensätze, auch „Pseudosamples“ genannt, mit dem Pro-

gramm „Seqboot“ (PHYLP; Felsenstein, 1985) erstellt. Aus ihnen wurden nach den oben beschriebenen Methoden Stammbäume berechnet und ein Konsensusstammbaum mit dem Programm „Consense“ (PHYLP) ermittelt. Die Äste des Konsensusstammbaums wurden mit den zuvor erstellten Stammbäumen verglichen. Der Bootstrapwert ist ein Maß der statistischen Sicherheit. Je höher er ist, desto besser ist ein Knotenpunkt abgesichert. Bei der Bayes'schen Analyse werden zunächst „Maximum Likelihood“-Werte berechnet welche dann mit Hilfe der Bayes'schen Formel in Wahrscheinlichkeiten umgerechnet werden. Mit Hilfe der Markov Chain Monte Carlo-Methode (Huelsenbeck et al., 2002) ist es dann möglich, die Verteilung von Wahrscheinlichkeiten (hier die Astlängen und die Topologie) mit einer endlichen Anzahl von Versuchen zu ermitteln.

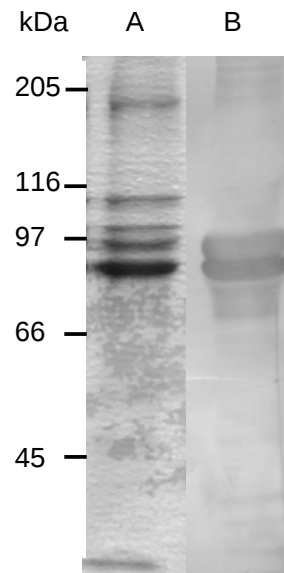
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Hämocyanine der Myriapoden

Aus dem Taxon der Myriapoda lag zu Beginn der Arbeit lediglich die vollständige Sequenz eines Diplopodenhämocyanins (*Spirostreptus spec.*; Kusche and Burmester, 2001) vor. Um festzustellen, ob dieses respiratorische Protein auch bei anderen Diplopoden vorkommt, wurde als weiterer Vertreter dieser Gruppe *Archispirostreptus gigas* untersucht. Innerhalb der Chilopoden waren bereits drei Hämocyaninunterheiten (Hc A, C, D) des Spinnenläufers (*Scutigera coleoptrata*) sequenziert (Hembach, 2002; Kusche, 2002) sowie eine weitere Untereinheit, die nicht Bestandteil des nativen Hämocyanins ist (HcX). Die Sequenz der vierten Untereinheit (HcB) fehlte und sollte im Rahmen der Arbeit aufgeklärt werden.

##### 3.1.1 Charakterisierung des Hämocyanins von *Archispirostreptus gigas*

Nachdem die proteinbiochemische Untersuchung der Hämolymphe von *A. gigas* mit Hilfe eines bereits vorhandenen spezifischen Antikörpers gegen das Hämocyanin von *S. spec.* (Jaenicke et al., 1999) zwei Banden ergeben hatte (Abb. 3.1), wurde eine cDNA-Bank aus den inneren Geweben des Tieres erstellt, in der dann mit Hilfe des Antikörpers nach den beiden gewünschten Hämocyaninsequenzen gesucht wurde. Hierbei konnte die cDNA-Sequenz einer vollständigen Untereinheit des Hämocyanins gefunden werden (Abb. 3.2), welche 2133 Basenpaare umfasst und sich in ein Polypeptid mit 653 Aminosäuren und einer, mit dem ExPASy Tool „Compute pI/Mw“ berechneten Molekülmasse von 73,5 kDa translatieren lässt. Das Hämocyanin hat einen, mit dem gleichen Programm theoretisch bestimmten, isoelektrischen Punkt (pI) von 6,16. Eine zweite Untereinheit konnte, trotz intensivem Durchmustern der cDNA-Bank, auf Sequenzebene nicht aufgeklärt werden. Das Hämocyanin von *A. gigas* zeigt das für den Transport aus dem endoplasmatischen Retikulum notwendige N-terminale Signalpeptid (vorhergesagt mit dem Expasy-Programm SignalP), welches eine Länge von 17 Aminosäuren aufweist.

**Abb. 3.1:**

SDS-PAGE mit der Hämolymphe von *Archispirostreptus gigas*. Coomassiefärbung (A) und Western-Blot (B) mit einem Antikörper gegen das Hämocyanin von *Spirostreptus spec.*

Die mit dem Antikörper markierten Hämocyaninuntereinheiten sind als Banden bei ca. 75 kDa erkennbar.

## Hämocyanin 1

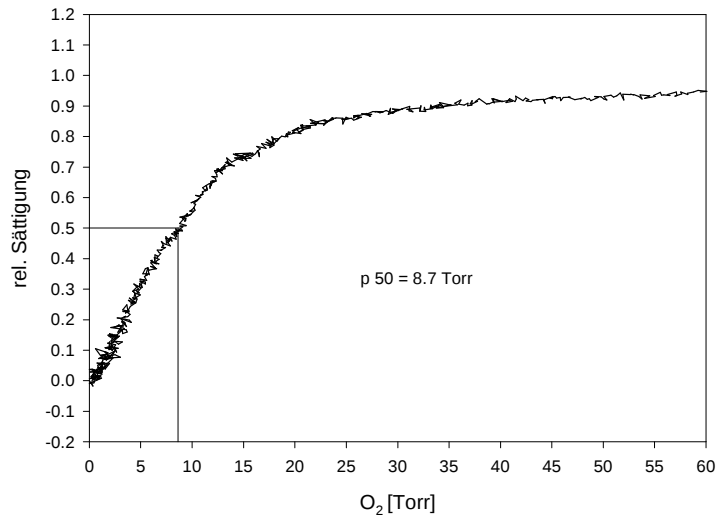
|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| AGAAGACGGCCGTCTGAGAATATTCTTGGCACCCAAAT                              | 39  |
| <b>ATG</b> AAACTTTTCGTTTTAGCCGTGGTCTACTGGCCACCACGGCAATCGCAGAAAAGTGC | 99  |
| <b>M K L F V L A V V L L A T T A I A E K C</b>                      | 20  |
| CCCAAACCGGTAAATGTAGAAGCCAAACAGAAAATGGTGGACACTCTGATCAGCTACATT        | 159 |
| P K P V N V E A K Q K M V D T L I S Y I                             | 40  |
| AACAAACCGGCCAATCCCGTTCCTCAAAGCCACCAATAGATCCAAAGAAATTAATAGGT         | 219 |
| N K P A N P V P P K P P I D P K K L I G                             | 60  |
| ATTGGAATTTTGCCGAAAGATCAAGTTTTCTCACTTTTTGACGAAAGGACGTGGGATGAA        | 279 |
| I G I L P K D Q V F S L F D E R T W D E                             | 80  |
| GTCAGTGAGGTCTGAAAAGATTTTTGGCGGCACCAACTTTTCGAAGACTTCATTAAAGTT        | 339 |
| V S E V L K R F L A A P T F E D F I K V                             | 100 |
| GCAGAAACGTTGTACCCTCACGTTAATGAGGACTTGTTCCTGTTCCGACTCTCCGTGGCC        | 399 |
| A E T L Y P H V N E D L F L F G L S V A                             | 120 |
| ATTGTCCATCGTCCAGATGCCAATGGTGTCCACGTACCTAGAGTACACGACGTTTATCCG        | 459 |
| I V H R P D A N G V H V P R V H D V Y P                             | 140 |
| GACAAATTCTTGACCAACGACGTCCTCATCAACATTTCGAAAACAAATCATTAAAGGACAC       | 519 |
| D K F L T N D V L I N I R K Q I I K G H                             | 160 |
| AAGAACCCCGTGGTGAAGGACCCCACTATTACCACAATGACTTCGACCCATTCCGTAGA         | 579 |
| K N P V V K D T H Y Y H N D F D P F R R                             | 180 |
| GTGGATTACTTCACCGAAGACCCCGGCATGAATTTCGCACCATTATCACTGGCACGTGTTG       | 639 |
| V D Y F T E D P G M N S H <b>H</b> Y H W <b>H</b> V L               | 200 |
| CACCCATCCATCTGGCACCAAGGCGTTGGAGAAAAAGCCAAACTTGGAGAATTATTCTAC        | 699 |
| H P S I W H Q G V G E K A K L G E L F Y                             | 220 |
| TGTATGCACCGACAAATGGTTGCCAGATTTGACAGCGAACTTTTGTCAGTCCATCTTCCT        | 759 |
| C M <b>H</b> R Q M V A R F D S E L L S V H L P                      | 240 |
| AGAATTCCTTCCCTCGATGACTGGAACAAAAAGTCAAGATCGGTTATGCCCTCACTTG          | 819 |
| R I P S L D D W N K K V K I G Y A P H L                             | 260 |
| ACCATCCAAGAACGGGTTACACCTACATGAACCGCCAGAGAACCTCGAAATTGAAGAT          | 879 |
| T I Q R T G Y T Y M N R P E N L E I E D                             | 280 |
| CTGCCTGAAGTACCAAGGGCGAGCTGATGCAGTGGGAAGACAGGATCATGGAGGCTATT         | 939 |
| L P E L T K G E L M Q W K N R I M E A I                             | 300 |
| GCTCGTCATAATATTACCCTAAAAGGAGGACCTGGTAAAAAACTTCGTGTCTCTCCCGAA        | 999 |
| A R H N I T L K G G P G K K L R V S P E                             | 320 |

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| ACCGGCATCGACGTGTTCCGGTCACTTGATCGCAGCCACGAAGAACAGCAGCAATCGCCAA       | 1059 |
| T G I D V F G H L I A A T K N S S N R Q                             | 340  |
| TACTATGGCAACCTACATTCTATGCCCATGTCATTGCAGCTAGAATTGCGGATTCAGAC         | 1119 |
| Y Y G N L <b>H</b> S Y A <b>H</b> V I A A R I A D S D               | 360  |
| GGTGAACATAAGGAAGACAATGGTGCCATGTACGACGTGGCCACTTCTGCCCAGATCCT         | 1179 |
| G E H K E D N G A M Y D V A T S A R D P                             | 380  |
| CTGTTTTACAGCTGGCACAAGTTCATTGACAAGATTTTCACCGAATACCAGAATACCTTG        | 1239 |
| L F Y S W <b>H</b> K F I D K I F T E Y Q N T L                      | 400  |
| ACGCCCTACACTCCTTACCAGCTGACATGGCCAGATGTTGTTCATCGATGGTATCCACATT       | 1299 |
| T P Y T P Y Q L T W P D V V I D G I H I                             | 420  |
| AAAACTTGAAAACCCATGAAGAAAATATGATTCACACCTATTACACCAGCAGCACTTTT         | 1359 |
| E N L K T H E E N M I H T Y Y T S S T F                             | 440  |
| AGGCTCAGCAAAGGCTTCGATTACACCAAGGACAGTGAGGCCAAGGTGATTGTAGAACAC        | 1419 |
| R L S K G F D Y T K D S E A K V I V E H                             | 460  |
| ACCGATCAGCAGGATTTCTTTACGTCATCGATATCGACAACAACGCCGAGTGGAAG            | 1479 |
| T D H D D F V Y V I D I D N N A R V E K                             | 480  |
| ACGGCCGTCCTGAGAATATTCTTGGCACCCAAATATGATGAGCGTGGTCATCCTTTGACA        | 1539 |
| T A V L R I F L A P K Y D E R G H P L T                             | 500  |
| CTGAAAGAACAGCGAGTCATGATGATTGAACTGGACAAATTTAAGGCCCACTGAAACCT         | 1599 |
| L K E Q R V M M I E L D K F K A P L K P                             | 520  |
| GGTCATAACGTTGTCCGTCGCTCTAACGAATCCAGCGTTACCATGCCTGTTGACCAC           | 1659 |
| G H N V V R R C S N E S S V T M P V D H                             | 540  |
| ATCTATGGTGATATCACACAGACTGTAGATGAGGACCATTGCCATTGTGGCTGGCCAGAG        | 1719 |
| I Y G D I T Q T V D E D H C H C G W P E                             | 560  |
| TACCTCTTGTTCCACAGGGTGATTACGATGGAATGCACTACGAACCTTTCTGATGGCC          | 1779 |
| Y L L V P Q G D Y D G M H Y E L F V M A                             | 580  |
| ACCAACTACGATGAAGACAAGGACCAAAACGCCGACATGTCCTGCAAATGCCACGCTCAC        | 1839 |
| T N Y D E D K D Q N A D M S C K C H A H                             | 600  |
| AGCTACTGCGGCAACATTTTAGGAGAGTACCTAGACAAAAGGCCATTGGGATATCCGTTT        | 1899 |
| S Y C G N I L G E Y L D K R P L G Y P F                             | 620  |
| GACAGAAAGATTAAAGCCGAGGCTGGGAAGAATTCAAGACCCAGAACATGTGTGACACT         | 1959 |
| D R K I K A A G W E E F K T Q N M C D T                             | 640  |
| GATGTCGTCATCAATTTTCTGGAAAAACCAAGCCCAAT <b>TA</b> AAACGTTTACCAGAGAWG | 2019 |
| D V V I K F S G K T K A Q                                           | 653  |
| ATTGTTTAAGTAAAAATAATGTGCGCCTATCTTATGCAGTGATCTGTACTGATTCTCAAA        | 2079 |
| <b>AAATAA</b> AAAAACCAATTTTCTAAACAAACTTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA      | 2133 |

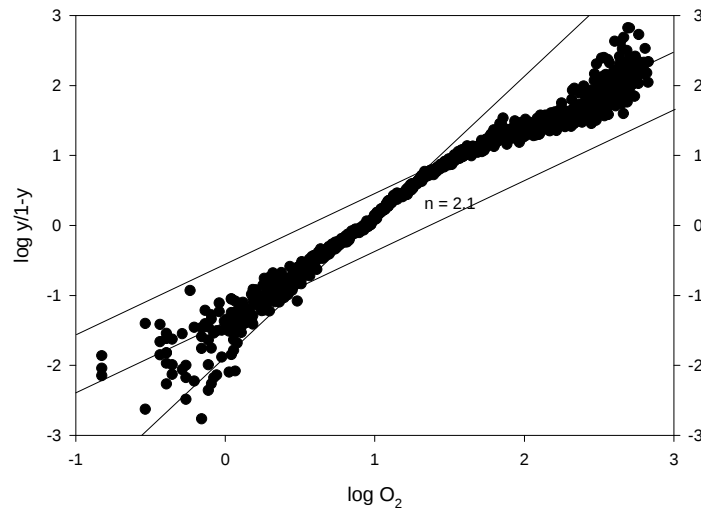
**Abb. 3.2:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) der Hämocyaninuntereinheit 1 von *A. gigas*.

Das Startcodon ist rot markiert, das putative Signalpeptid unterstrichen. Die Histidine, welche mit den Kupferionen der Sauerstoffbindungsstelle koordiniert sind, wurden blau markiert. Stopcodon sowie das Polyadenylierungssignal sind grün gefärbt.

Zur weitergehenden Charakterisierung des Hämocyanins von *A. gigas*, bezüglich seiner Sauerstoffbindungseigenschaften wurde eine Sauerstoffbindungskurve (Institut für Biophysik, Arbeitsgruppe Prof. Decker) gemessen. Das Hämocyanin des Diplopoden weist in der Messung bei pH 8 einen  $P_{50}$ -Wert von  $\approx 8,7$  Torr und einen Hill-Koeffizienten von  $h = 2,1$  auf (Abb. 3.3 und 3.4).



**Abb. 3.3:** Sauerstoffbindungskurve von *A. gigas*. Die Messung wurde bei einem pH-Wert von pH 8 durchgeführt. Der  $P_{50}$ -Wert liegt bei 8,7 Torr.

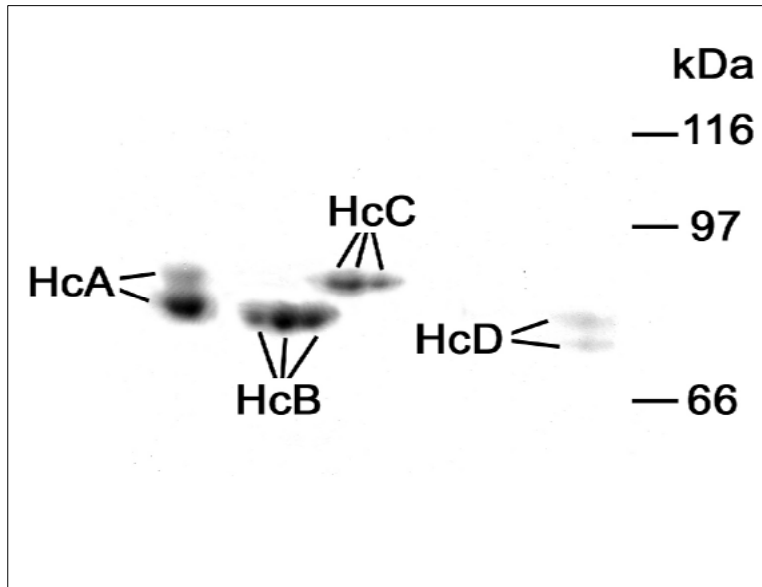


**Abb. 3.4:** Hill-Plot von *A. gigas*. Der Hill-Koeffizient, welcher ein Maß für die Kooperativität ist, liegt bei  $h = 2,1$ .

### 3.1.2 Charakterisierung der Hämocyaninuntereinheiten von *Scutigera coleoptrata*)

Die Struktur des Spinnenläuferhämocyanins ist bereits eingehend untersucht worden (Mangum et al., 1985; Gebauer und Markl, 1999). Es handelt sich, wie bei *Spirostreptus spec.* sowie *A. gigas* (Jaenicke et al., 1999; Kusche und Burmester, 2001) um ein 6x6-meres Protein (Mangum et al., 1985). Das Hämocyanin besteht bei *S. coleoptrata* aus vier immunologisch und elektrophoretisch verschiedenen Untereinheiten (A-D), die in einem Verhältnis von 2:2:1:1 vorliegen (Gebauer und Markl, 1999).

Der biochemische Nachweis der vier Hämocyaninuntereinheiten beim Spinnenläufer war bereits in Form einer zweidimensionalen SDS-PAGE erfolgt (Abb. 3.5). Hierbei konnten zehn Spots identifiziert werden, die Molekülmassen von 75-80 kDa aufwiesen und deren isoelektrische Punkte zwischen 5 und 6,5 lagen. Diese Proteinspots wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie den vorhandenen Sequenzen zugeordnet (der MALDI-TOF wurde von der Firma Proteosys durchgeführt). Dabei konnten vier verschiedene Untereinheiten gefunden werden. HcA und HcD bilden jeweils zwei Punkte, die leicht in der Größe variieren, was auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sein könnte. Bei HcB und HcC sind jeweils drei Spots vorhanden, bei denen es sich wahrscheinlich um Ladungsvarianten handelt. Drei der Untereinheiten waren bereits sequenziert (HcA, C, D; Kusche, 2001; Hembach, 2002). Von einer weiteren, hoch abgeleiteten Untereinheit, welche nicht im nativen Protein vorkommt, war die Sequenz ebenfalls bekannt (HcX). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, die letzte fehlende Hämocyaninuntereinheit (HcB) von *S. coleoptrata* vollständig zu sequenzieren (Abb. 3.6).



**Abb. 3.5:**  
Zweidimensionale  
SDS-PAGE der Hämolymphe von *S. coleoptrata*.  
Im Hämocyanin sind vier verschiedene Untereinheiten vorhanden.  
(Hembach, 2002)

Die cDNA-Sequenz ist 2301 Basenpaare lang, und beinhaltet einen offenen Leserahmen von 2202 Basenpaaren. Das daraus resultierende Polypeptid ist 659 Aminosäuren lang und weist eine Molekülmasse von 73,9 kDa auf ( $P_i = 5,57$ ). Ein N-terminales Signalpeptid von 18 Aminosäuren ist, wie für die Myriapoden üblich, vorhanden. Die Sequenz wurde in der EMBL/Genbank Datenbank unter der Zugriffsnummer AJ512793 eingereicht.

## Hämocyanin B

```

GGGGGTGGTAAGACTCGGTCGCTGACAACAGATCCCACGAAAACA      45
ATG GTAGCCAAGTGGTGTGTTTTGGCCATGTGCCTTTTAGTAGCAGTGGGTGCAGATAAG      105
M V A K W C V L A M C L L V A V G A D K      20
TGTCGCGAGCTACGGACCAAGAAGCCAAGCAGAAAAGGATGTTAGAAGTTCTTCAGCAC      165
C P R A T D Q E A K Q K R M L E V L Q H      40
GTCAATAAGCCTTATGTGGCTGAAACCAAGGATCCTAAGATTCCAGCTGGATCTGAGGAC      225
V N K P Y V A E T K D P K I P A G S E D      60
GTTTTCAACACTTAGGCATTCTGGAAAAGCACGAAGTCTTCTCCCTTTTCGACGAGAGA      285
V F K H L G I L E K H E V F S L F D E R      80
CAGTGGGACGAAGCCACAACAGCGGCCGTCTATATGTTAACTGCCCCAGTTTCGATGAA      345
Q W D E A T T A A V Y M L T A P S F D E      100
TTCATCGACAGAGCGGAGATTGTTTCGTCATCGTATCAACGAGGACATGTTTTACTACGCT      405
F I D R A E I V R H R I N E D M F Y Y A      120
TTCTCCGTAGCTGCCGTTTCATCGTGATGACACCCGTGGAATCAACCTTCCCCGCATCCAC      465
F S V A A V H R D D T R G I N L P R I H      140
GAAATCTACCCTGATAAGTTTCTCAAGCACAAGGTCATCGTCGAAGTCAAGAACAGCATC      525
E I Y P D K F L K H K V I V E V K N S I      160
AACTCCGCGCAGGAAGATCCCCTTATTGATGCTACTCATGAATTCATGATCTCCGTGAC      585
N S G Q E D P L I D A T H E F T D L R D      180
CCTAACAGCAAACCTCATTACTTCTTGAAGATGTTGGTCTTAACCTCTCACCATTACCAT      645
P N S K L H Y F L E D V G L N S H H Y H      200
TGGCAGCTTATCCACCCTGCTGTCTGGCAAGAATCCCTGGAGGAAC TGACCCATCAGCAC      705
W H V I H P A V W Q E S L E E L T H Q H      220
AAGGACCGTAAGGGTGAACCTTTCTACTTCATGCATCACCAGATGGTTAACAGATACGAC      765
K D R K G E L F Y F M H H Q M V N R Y D      240
GCTGAGCGCTTGTCTAATGGTTTGCCAAGAAGTACAACCTTTGAAAAC TGGAACGATCCA      825

```

|                                                                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| A E R L S N G L P R S T T F E N W N D P                               | 260  |
| ATTGAGACGGGTTATGCTCCACATCTTACCATTGATAGAAGTGGTTACCGTTATCAATTC          | 885  |
| I E T G Y A P H L T I D R T G Y R Y Q F                               | 280  |
| CGTCCAGACAATCTCGTTGTGAGGGATCTTCCAGAACTTACCAAAAATCATATGAGACAA          | 945  |
| R P D N L V V R D L P E L T K N H M R Q                               | 300  |
| TGGAGAGACAGAATCTTTATGCTGTTTACAGAGGAGAAGCTTTAGCTGCCAACGGTAGC           | 1005 |
| W R D R I L Y A V H R G E A L A A N G S                               | 320  |
| TCAGTATCCCTTCGTGACGAAAAGAGGTATTGATGTTCTTGGTAACATGGTTGAATCTAGT         | 1065 |
| S V S L R D E R G I D V L G N M V E S S                               | 340  |
| CTCCAAAGTATCAACAGACCATTCTATGGTAATGTTTCTTGTATGCTCACGTGATTGCT           | 1125 |
| L Q S I N R P F Y G N V <b>H</b> C Y A <b>H</b> V I A                 | 360  |
| GCTCGTATTGCCGATCCTGATGGCAAATACGGAGAAGACAACGGTGCTATGTACGATGTG          | 1185 |
| A R I A D P D G K Y G E D N G A M Y D V                               | 380  |
| GCCACATCTGCTCGTGATCCTCTTTTCTACCAATGGCACAAGTTTCAATGACAATCTCTTC         | 1245 |
| A T S A R D P L F Y Q W <b>H</b> K F I D N L F                        | 400  |
| CATGAATACAAAGATGCACTGAAAGCCTACAGCAGTGAAGATCTCACTTATAATGATATC          | 1305 |
| H E Y K D A L K A Y S S E D L T Y N D I                               | 420  |
| ACCATTGAAGAAGTCAATGTTCAAGGAGAAGGTGGTTCCTCCAGCTAACACTGTACCACA          | 1365 |
| T I E E V N V Q G E G G S P A N T V T T                               | 440  |
| TTTTTGGAGAACAGCATCGTTTCTGATGAAGGCTTTTCTTTTCACTGCTCGCGGCCAC            | 1425 |
| F L E N S I V H L D E G F S F T A R G H                               | 460  |
| GCCAGGGTCAAGGTACAGCATTTGCAGCATGAGGGCTTCACTACCAGATCAAGGTAAAC           | 1485 |
| A R V K V Q H L Q H E G F N Y Q I K V N                               | 480  |
| AACGCTGGTGGTGAACATAAGGTTGTCTTCCGTGTCTTCTAGCTCCCAAATACGACGAA           | 1545 |
| N A G N E H K V V F R V F L A P K Y D E                               | 500  |
| GAGCATCATGAATTTGACTTCAATGAACAACGCGGTATGGCCATTGAATTAGACAAATTC          | 1605 |
| E H H E F D F N E Q R G M A I E L D K F                               | 520  |
| GTGCGCACAGTTTCTGCTGGCTCATCCACCGTGGAAACAGCACTCTCCAAGTCCAGTGTT          | 1665 |
| V A T V P A G S S T V E Q H S S K S S V                               | 540  |
| ACTCAGAGAACGACAACCTTCTACGGCTCTTCCGCTACCAGAGCTCAGAGAATCACTGC           | 1725 |
| T Q S N D N F Y G S S A T R S S E N H C                               | 560  |
| AGTGTGCGGTGGCCTGACTACCTCCTCATCCCCAAGGAAACCATCAAGGAGTCCAGTTC           | 1785 |
| S C G W P D Y L L I P K G N H Q G V Q F                               | 580  |
| AATGTCTAGTATTGCCACTAGCTACGATGAGGATCATGTTGAGAGCGATGAGAGTTGT            | 1845 |
| N V Y V I A T S Y D E D H V E S D E S C                               | 600  |
| CACTGCGGCGATTGCTGAGCTACTGCGGTGCCCTGTATGACAAATACCCCGACAGGAGG           | 1905 |
| H C G D S L S Y C G A L Y D K Y P D R R                               | 620  |
| CCCATGGGATACCCCTTCGATCGCCACGCCGACGCCAGACCTTCGATGAATTCAAGACC           | 1965 |
| P M G Y P F D R H A D A Q T F D E F K T                               | 640  |
| AAAAACATGAACCTCCGTCACAGTCACCATCAAACACACTGGCGAAGTCAAGGACGCAT <b>AA</b> | 2025 |
| K N M N S V T V T I K H T G E V K D A                                 | 659  |
| GCTGAAACCTCACTCACCATCCACTCAATCAATTGTAAATAAATGTTGTTTAAACTTT            | 2085 |
| GACGAGAAATTGACGCAGAACACGCGCTCGAGAGATTGAAGAGACAAGAAGTTCACAAA           | 2145 |
| TTGAAAGATATTTTATTGCCCGTTTCGGGAATTTGTGGACCACAAAAAAGACTGTCCTGTT         | 2205 |
| GTTTGTGTGAATGATGGAATCTTTCCTCGTTTATTGTACATTAAGTGTGTTATTTTTTTTA         | 2265 |
| AGCCAA <b>AAATAA</b> ACTTTCAAAGAAAAA                                  | 2301 |

**Abb. 3.6:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) von Hämocyaninuntereinheit B von *S. coleoptrata*.

Das Startcodon ist rot markiert, das putative Signalpeptid unterstrichen. Die Histidine, welche mit den Kupferionen der Sauerstoffbindungsstelle koordiniert sind, wurden blau markiert. Stopcodon sowie das Polyadenylierungssignal sind grün gefärbt.

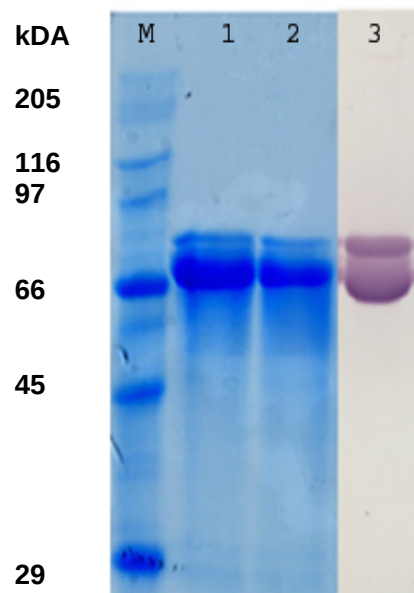
### 3.2 Hämocyanine der Cheliceraten

Innerhalb der Cheliceraten sind Hämocyanine weit verbreitet und vor allem proteinbiochemisch gut charakterisiert (z.B. Markl, 1986; Markl und Decker, 1992; van Holde und Miller, 1995). Von den drei Spinnenarten (Arachniden) *Eurypelma californicum* (Eca), *Cupiennus salei* (Csa) und *Nephila inaurata* (Nin), sind die cDNA-Sequenzen aller Hämocyaninuntereinheiten bestimmt worden (a-g; Voit et. al., 2000; Ballweber et al., 2002; Averdam et al., 2003). Von *Limulus polyphemus* (Merostomata, Xiphosura) hingegen existierte bislang lediglich eine Proteinsequenz der Untereinheit II (Nakashima et al., 1986). Sequenzdaten auf cDNA-Ebene waren nicht vorhanden und sollten im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden.

#### 3.2.1 Charakterisierung der Hämocyaninuntereinheiten von *Limulus polyphemus*

Das Hämocyanin von *L. polyphemus* ist proteinbiochemisch und strukturell bereits ausführlich untersucht (z.B. Lamy et al., 1983; Kempter und Markl, 1985). Es handelt sich um ein 8x6-mer, welches aus acht unterschiedlichen Untereinheiten besteht (nach Lamy et al., 1983: I, II, IIa, IIIa, IIIb, IV, V, VI) und damit das größte bekannte Arthropodenhämocyanin ist.

Nachdem in der Hämolymphe der Versuchstiere im Western-Blot, mit Hilfe eines (bereits vorhandenen) spezifischen Antikörpers gegen das Hämocyanin von *L. polyphemus*, verschiedene Banden der gewünschten Größe (70-80 kDa) nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.7; Jacobs, 2003), wurde aus den gesamten Geweben eines Exemplares von *L. polyphemus* eine cDNA-Bank hergestellt. Diese wurde im Rahmen eines Antikörperscreenings auf die gesuchten cDNA-Sequenzen der Hämocyaninuntereinheiten durchmustert. Dabei wurde die vollständige Sequenz der Hämocyaninuntereinheit II (Abb. 3.9), sowie Teilsequenzen der Untereinheiten I, IV und V/VI aufgeklärt (Abb. 3.8; 3.10-3.11). Die cDNA von *L. polyphemus* Hämocyanin II besteht aus 2248 Basenpaaren, kodiert für eine vollständige Hämocyaninuntereinheit und lässt sich in ein natives Protein mit 629 Aminosäuren sowie einer Molekülmasse von 72,8 kDa (pI = 5,93) translatieren. Ein Signalpeptid ist laut Computeranalyse der Sequenz mit SignalP nicht vorhanden. Die Nukleotidsequenz der Untereinheit II von *L. polyphemus* ist bis auf einen Aminosäureaustausch an Position 25 (statt des von uns gefundenen Asparagins findet sich in der Peptidsequenz an dieser Stelle Aspartat) identisch mit der bereits vorliegenden Aminosäuresequenz.



**Abb. 3.7:**  
SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt (1, 2) und Western-Blot (3) der Hämolymphe von *L. polyphemus*. Es sind mehrere Banden zu sehen. Eine komplette Auftrennung war nicht möglich.  
(Jacobs, 2004)

### Hämocyanin I

```

GACTTTGACGATCTCATGCACCTACTCGAACAAGCACGAAATACTGTCAACGAGGGTATG      60
D F D D L M H L L E Q A R N T V N E G M                               20
TTTGTCTATGCCGCTACAGTAGCCGTGCTTCACCGTGACGATTGCCGAGGAGTTACTGTC      120
F V Y A A T V A V L H R D D C R G V T V                               40
CCTCCAATAGAAGAAGTGTTCCTGACAGGTTTATACCAGTCGAAACCATCCGACACGCT      180
P P I E E V F P D R F I P V E T I R H A                               60
GATAAGGAAGCGGCTGCTCATCCTGATAAGGATATTGTTGTGGAGTTTGAGGAGACTGGC      240
D K E A A A H P D K D I V V E F E E T G                               80
AATATTTTGGATCCCGAGTACCGATTGGCTTACTATAGGGAAGATGTTAGCATCAACCGC      300
N I L D P E Y R L A Y Y R E D V S I N R                               100
CATCATTGGCACTGGCATATTGTTTATCCCGCCACCTGGCGTCCAGAATTTATGCACAAA      360
H H W H W H I V Y P A T W R P E F M H K                               120
GAGAAGGACCGAAAGGAGAACTCTTCTACTATATGCATCAACAGATGTGTGCCCGATAT      420
E K D R K G E L F Y Y M H Q Q M C A R Y                               140
GATTGTGAACGTTTATCTAACGGAATGCACCGTATGTTTCCCTTCAACGACTTTTCATGAA      480
D C E R L S N G M H R M F P F N D F H E                               160
GAACTCGAGGGGATACTCTCCTCACTTGACTTCCCTGATTAGTGTTTGAATTACGGTACT      540
E L E G Y S P H L T S L I S G L N Y G T                               180
CGACCCGATGGCTTGAACTTCATGACCTTCATGACGTCACCATCCAGGATATGGAGCGC      600
R P D G L K L H D L H D V T I Q D M E R                               200
TGGAGGGGAAAGAATCCATGACGCCATCGACCTGAAGATGGTTCATGACCACCATGGTAAA      660
W R E R I H D A I D L K M V H D H H G K                               220
GAGGTTGCTGTTGATGACGAACATGGCATTGATATCCTTGTTGCTTGTTGAGTCTAGT      720
E V A V D D E H G I D I L G A L V E S S                               240
CATGAATCTGTTAACCGGCTTCTACGGCAGTTTGCATAACTGGGGCCACGTGCTGACA      780
H E S V N Q G F Y G S L H N W G H V L T                               260
GCTCGTGCTCATGCCGAGGGCAAGTTTCATGAAAATCCAGGCGTGATGAGCGACACC      840
A R A H D P E G K F H E N P G V M S D T                               280
TCTACATCTCTACGTGATCCAATTTTCTACAGATGGCACAGGACTCTTGATAACCTGTTC      900
S T S L R D P I F Y R W H R T L D N L F                               300
CAGGAATACAAAGAATCTCTGTGCGCCTACACAAAGGAAGAGCTATCATTCCAGGAGTT      960
Q E Y K E S L S P Y T K E E L S F P G V                               320

```

|                                                              |      |
|--------------------------------------------------------------|------|
| GAGGTTCTCAGTGCTACTGTGAAGGCCAAGACCGACAACGTTATCATTACATCTATGGTT | 1020 |
| E V L S A T V K A K T D N V I I T S M V                      | 340  |
| GAGAGCGAACTGGAGCTTACCCATGGAATCAACTTCGGTACTGATCACTCTGTGAAGGTG | 1080 |
| E S E L E L T H G I N F G T D H S V K V                      | 360  |
| AAATACAACCATCTCGATCATGAATCATTCAGCTATCAAATTAAGTAGAGAACACTTCC  | 1140 |
| K Y N H L D H E S F S Y Q I K V E N T S                      | 380  |
| GGCTCCACCAAGCATGCCACTGTGAGAGTTTTCTTGGCTCCCAAATATGATGAAGTGGGT | 1200 |
| G S T K H A T V R V F L A P K Y D E L G                      | 400  |
| AACCTTCTGCATCCCAATGACCAACGACGTCTCTGTATTGAGCTCGACAAGTTCACAAA  | 1260 |
| N L L H G P N D Q R R L C I E L D K F H K                    | 420  |
| GAACTAAAGGCCGGAATAATGAAATCACACGTAACCTCCGTGGATTCCAGTGTGACTATC | 1320 |
| E L K A G K N E I T R N S V D S S V T I                      | 440  |
| TCCACTCTACATACTTTTGATGAGCTGGAGAGTGGTGTGGAGTGAACGAGAATGCTGAT  | 1380 |
| S T L H T F D E L E S G V G V N E N A D                      | 460  |
| GAATACTGCAGCTGTGGATGGCCGAAGAACATGCTGGTACCACGTGGTAACAACAAGGGA | 1440 |
| E Y C S C G W P K N M L V P R G N N K G                      | 480  |
| ATGACCTTTGAACTCTTCGTGATGCTGACTGACTGGGAACATGACAATGTTGGCGGAAAA | 1500 |
| M T F E L F V M L T D W E H D N V G G K                      | 500  |
| GGATCTGACAACCACATGTGCGATGACGCTGTCAGTTATTGTGGAGCTAAAGATAGCAAG | 1560 |
| G S D N H M C D D A V S Y C G A K D S K                      | 520  |
| TACCCCGATAAAAAACCAATGGGGTTCCCTTCGATCGACGAATCGATGCACACGATATT  | 1620 |
| Y P D K K P M G F P F D R R I D A H D I                      | 540  |
| GAGGAATTCCTAACCCCAAATATGGCGTTGACTGATGTAAAGATCAAGTTCGAAGGT    | 1680 |
| E E F L T P N M A L T D V K I K F E G                        | 560  |
| AAACCAATATAAGAACTTTACTGTGATCTCAAACGAATACAGCTTGTACTATCAGTTGT  | 1740 |
| AATACTAACTAAAAATGACNAATTGAAATTGAAAACA                        | 1800 |
| AAAAAAAAAAAAAAAAA                                            | 1816 |

**Abb. 3.8:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) der Hämocyaninuntereinheit I von *L. polyphemus*.

Am 5'-Ende fehlen etwa 250 Basenpaare. Daher fehlen Startcodon und Signalpeptid. Die Histidine, welche mit den Kupferionen der Sauerstoffbindungsstelle koordiniert sind, wurden blau markiert. Stopcodon sowie das Polyadenylierungssignal sind grün gefärbt.

## Hämocyanin II

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| ATCCTCCAGCTGTCGTTGGTGCAGAAGAAGACTTTGTCAAACAGTC                | 46   |
| ATGACCTTGCACGACAAACAAATCCGTGTGTGCCACTTGTTCGAGCAGCTCAGCTCAGCT  | 106  |
| M T L H D K Q I R V C H L F E Q L S S A                       | 20   |
| ACCGTAATTGGGAATGGCGACAAACATAAACATAGCGTAGGCTGAAGAACGTTGGTAAA   | 166  |
| T V I G N G D K H K H S D R L K N V G K                       | 40   |
| CTTCAGCCTGGTGCTATCTTCTCCTGCTTCCATCCCGACCACTTGGAGGAAGCACGCCAC  | 226  |
| L Q P G A I F S C F H P D H L E E A R H                       | 60   |
| CTGTATGAGGTCTTCTGGGAGGCTGGAGATTTTAATGATTTTATCGAGATAGCGAAGGAA  | 286  |
| L Y E V F W E A G D F N D F I E I A K E                       | 80   |
| GCTCGTACCTTCGTGAACGAAGGCCTGTTTGCCTTCGCTGCTGAAGTTGCTGTGCTTCAC  | 346  |
| A R T F V N E G L F A F A A E V A V L H                       | 100  |
| CGTGACGACTGCAAGGGCCTGTACGTTCCCCAGTTCAAGAAATCTTCCCTGATAAGTTC   | 406  |
| R D D C K G L Y V P P V Q E I F P D K F                       | 120  |
| ATCCCATCTGCAGCTATCAACGAGGCCTTTAAGAAGGCTCATGTGCGACCAGAATTTGAC  | 466  |
| I P S A A I N E A F K K A H V R P E F D                       | 140  |
| GAGTCTCCAATTCTAGTGGATGTGCAAGATACTGGAAATATTCTGGACCCTGAATATCGT  | 526  |
| E S P I L V D V Q D T G N I L D P E Y R                       | 160  |
| TTAGCCTACTACCGTGAAGATGTAGGCATTAACGCTCACCATTGGCACTGGCATCTGGTT  | 586  |
| L A Y Y R E D V G I N A H H W H W H L V                       | 180  |
| TACCCATCAACATGGAACCCGAAATACTTTGGCAAAAAGAAAGACAGAAAAGGAGAACTG  | 646  |
| Y P S T W N P K Y F G K K K D R K G E L                       | 200  |
| TTTTATTATCTGCACCAACAGATGTGTGCCAGGTATGATGTGAGCGGCTTTCCAACGGT   | 706  |
| F Y Y M H Q Q M C A R Y D C E R L S N G                       | 220  |
| ATGCATCGTATGTTGCCATTCAACAACCTTCGACGAGCCACTGGCCGGATATGCTCCTCAT | 766  |
| M H R M L P F N N F D E P L A G Y A P H                       | 240  |
| CTGACTCATGTTGCTAGCGGAAAATATTACTCTCCTCGTCCGGATGGTTTGAACCTTAGA  | 826  |
| L T H V A S G K Y Y S P R P D G L K L R                       | 260  |
| GATCTGGGTGATATCGAGATTTTCAGAAATGGTGCGCATGCGGGAAAGAATTTTGGACTCC | 886  |
| D L G D I E I S E M V R M R E R I L D S                       | 280  |
| ATTCATTTGGGATATGTCATCAGCGAAGACGGCAGCCACAAGACACTGGACGAACTTCAC  | 946  |
| I H L G Y V I S E D G S H K T L D E L H                       | 300  |
| GGAACGTATATTTGGGTGCTTTAGTTGAATCCAGTTACGAATCCGTTAACCATGAATAC   | 1006 |
| G T D I L G A L V E S S Y E S V N H E Y                       | 320  |
| TATGGAACCTACACAACTGGGGCCATGTGACTATGGCTCGTATCCATGACCCTGATGGC   | 1066 |
| Y G N L H N W G H V T M A R I H D P D G                       | 340  |
| AGATTCCATGAGGAACAGGGGTGATGAGTGACACTTCCACTTCCCTCCGTGACCCAATC   | 1126 |
| R F H E E P G V M S D T S T S L R D P I                       | 360  |
| TTCTACAACCTGGCACAGATTCATTGATAACATATTCCACGAATACAAGAATACACTGAAG | 1186 |
| F Y N W H R F I D N I F H E Y K N T L K                       | 380  |
| CCCTATGACCACGACGTGCTAAACTTCCCAGACATTCAAGTCCAGGATGTTACCTTGCAC  | 1246 |
| P Y D H D V L N F P D I Q V Q D V T L H                       | 400  |
| GCCAGGGTTGACAATGTAGTTCACACTTTTCATGCGCGAGCAGGAGCTTGAGTTGAAGCAC | 1306 |
| A R V D N V V H T F M R E Q E L E L K H                       | 420  |
| GGCATTAACCCAGGAAATGCTCGTTCTATTAAGGCTCGCTATTACCACCTCGACCACGAG  | 1366 |
| G I N P G N A R S I K A R Y Y H L D H E                       | 440  |
| CCTTTTCAGCTATGCCGTTAACGTCCAGAACACAGCGCCTCTGATAAGCATGCCACTGTC  | 1426 |
| P F S Y A V N V Q N N S A S D K H A T V                       | 460  |
| CGTATCTTCTTGGCACCTAAATACGATGAACCTTGGCAACGAGATCAAGGCCGATGAGCTT | 1486 |
| R I F L A P K Y D E L G N E I K A D E L                       | 480  |
| CGTCGTACAGCTATTGAACTGGACAAGTTCAAGACAGATTTACACCCCGGTAAGAACACT  | 1546 |
| R R T A I E L D K F K T D L H P G K N T                       | 500  |
| GTGGTTCGTCATTCCCTGGACTCCAGCGTGACCCTCTCCACCAACCTACGTTTGAGGAT   | 1606 |
| V V R H S L D S S V T L S H Q P T F E D                       | 520  |
| CTATTGCATGGAGTAGGACTGAATGAGCATAAGTCAGAGTACTGCAGCTGCGGATGGCCT  | 1666 |
| L L H G V G L N E H K S E Y C S C G W P                       | 540  |

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| AGCCATCTGCTTGTCCCCAAAGGCAACATAAAAGGAATGGAATATCATCTGTTCGTCATG  | 1726 |
| S H L L V P K G N I K G M E Y H L F V M                       | 560  |
| TTAACAGACTGGGATAAAGATAAGGTCGACGGTAGTGAATCAGTTGCTTGTGTAGACGCT  | 1786 |
| L T D W D K D K V D G S E S V A C V D A                       | 580  |
| GTCAGCTACTGTGGAGCCCGAGACCACAAATATCCTGACAAGAAACCCATGGGTTTCCCA  | 1846 |
| V S Y C G A R D H K Y P D K K P M G F P                       | 600  |
| TTCGATAGACCTATCCATACAGAACACATCTCTGATTTCTGACCAACAACATGTTTATC   | 1906 |
| F D R P I H T E H I S D F L T N N M F I                       | 620  |
| AAGGACATCAAAATAAAATTCCACGAATAGTCAGATGTTTAATACTTGTTACCGTGATCA  | 1966 |
| K D I K I K F H E                                             | 629  |
| GATGGCTGATTTTTGTGGTGGAAAAAATATAATTGGAACAGTTTTTCGATAAATTGTTT   | 2026 |
| TGGGGTAGCCTAACCCAGTATAAACAACGCACATACACATAAATTTATTTCTCAAATTAT  | 2086 |
| TTAACATGTAGTAAGTTAAAGTCTGTGGATTAAGAAATATTTAAAGAATGTTTTTGCTTA  | 2146 |
| GCTGATGAACCTCTTGC GTGTATGTTACATTTTATTATTCTTAGGTCTGACTGCAGAATT | 2206 |
| TAAATAAATTGACCAACAACATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                | 2248 |

**Abb. 3.9:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) der Hämocyaninuntereinheit II von *L. polyphemus*.

Das Startcodon ist rot markiert. Die Histidine, welche mit den Kupferionen der Sauerstoffbindungsstelle koordiniert sind, wurden blau markiert. Stopcodon sowie das Polyadenylierungssignal sind grün gefärbt.

## Hämocyanin IV

|                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------|-----|
| GGAGAACTGTTTTACTACATGCACCAACAGATGTGTGCCAGATATGACTGCGACAGGATG | 60  |
| G E L F Y Y M <b>H</b> Q Q M C A R Y D C D R M               | 20  |
| TCTGTTGGGTTACAGCGGATGATCCCCTTCCAAAATTTTGAAGAAACCTTGGAGGGCTAC | 120 |
| S V G L Q R M I P F Q N F E E T L E G Y                      | 40  |
| TCTGCTCACTTGACCTCACTGGTTAGCGGTCTTCACTACGCCAGCCGACCAGAAGGCCTA | 180 |
| S A H L T S L V S G L H Y A S R P E G L                      | 60  |
| CACATCCGGGATCTCAATGATGTCACTCTCCAGGAGATGGAACGCTGGAGAGAAAGAATA | 240 |
| H I R D L N D V S L Q E M E R W R E R I                      | 80  |
| TTGGAGGGTATTAACCTTGGTCACGTGCACGACGATCACGGCAAAGAAGTCGAAGTGGAC | 300 |
| L E G I N L G H V H D D H G K E V E L D                      | 100 |
| GAGGAACACGGAATCGATATTCTAGGGGCTCTGATTGAGTCCAGTCATGAATCCAAGAAT | 360 |
| E E H G I D I L G A L I E S S H E S K N                      | 120 |
| GAGGAATATTATGGTAGCTTGCACTGGGGCCACGTAATGCTGGCACGTGTCCACGAT    | 420 |
| E E Y Y G S L <b>H</b> N W G <b>H</b> V M L A R V H D        | 140 |
| CATGATGGCCGATTCCATGAAAACCCAGGAGTCATGAGTGATACTTCCACATCTCTCCGC | 480 |
| H D G R F <b>H</b> E N P G V M S D T S T S L R               | 160 |
| GATCCAATTTTCTACCGTTACCACAGGTTTATCGACAATATGTTCCAGGAATATAAGGCC | 540 |
| D P I F Y R Y H R F I D N M F Q E Y K A                      | 180 |
| AGTCTACATCATTACCAAGACAGAATTGACCTTTCCTGAAATCTCAATTTCCCATGTC   | 600 |
| S L H H Y T K T E L T F P E I S I S H V                      | 200 |
| ACTATTAAGCTAAAGTTCCGAACATCATT                                | 630 |
| T I K A K V P N                                              | 210 |

**Abb. 3.10:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) der Hämocyaninuntereinheit IV von *L. polyphemus*.

Am 5'-Ende fehlen etwa 500 Basenpaare, am 3'-Ende etwa 820 Basenpaare. Daher fehlen neben Startcodon und Signalpeptid auch Stopcodon und Polyadenylierungssignal. Die Histidine, welche mit den Kupferionen der Sauerstoffbindungsstelle koordiniert sind, wurden blau markiert (die ersten beiden Histidine der CuA-Bindungsstelle fehlen).

## Hämocyanin V oder VI

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| TTCCATGCTGAGCACCTAGCAGCAGCCACCAAGCTGTACGAAGTGCTGATCGGTGCTAAG  | 60   |
| F H A E H L A A A T K L Y E V L I G A K                       | 20   |
| ACGTTGAGGAGTTTTGGACTTATGCCACCAGGTTTCGTGATTTTGTCAACGAAGGACTT   | 120  |
| T F E E F L D L C H Q V R D F V N E G L                       | 40   |
| TATGTGTATGCCGTCTCTGTCGCTATCCTCCATCGTCCAGATTGTAAAGGGGTGAGTCTC  | 180  |
| Y V Y A V S V A I L H R P D C K G V S L                       | 60   |
| CCACCTATCCAGGAAATCTTCCTGACAAATTCGTGACTGTGCAGACACTGTATGATGCC   | 240  |
| P P I Q E I F P D K F V T V Q T L Y D A                       | 80   |
| TTCAAGGAATTTTGGCAAACCCACACAAAGAGGAAGATGTTATTGTTGATATGCAAACC   | 300  |
| F K E F W Q N P H K E E D V I V D M Q T                       | 100  |
| ACTGGTAATATTCTTGACCCAGAATACAATTTGGCTTATTACCGTGAAGATATTGGAATA  | 360  |
| T G N I L D P E Y N L A Y Y R E D I G I                       | 120  |
| AACGCTCATCACTGGCATTGGCATCTAGTGTATCCCGCACCTGGCGACCAGAAGTGATA   | 420  |
| N A H H W H W H L V Y P A T W R P E V I                       | 140  |
| GGCAAGGTAAAGGACAGGAAAGGAGAGTTGTTCTACTACATGCATCAGCAGATGTGTGCT  | 480  |
| G K V K D R K G E L F Y Y M H Q Q M C A                       | 160  |
| AGGTATGATTGTGAAAGGTTGTCTAATGGCATGCCAGGATGGAACCATTCATAATTTT    | 520  |
| R Y D C E R L S N G M P R M E P F H N F                       | 180  |
| CACGAACCTCTAGAGGGCTACTCCTCCCACCTAAGTTCGTCGATCAACGGCTTACCCTAT  | 600  |
| H E P L E G Y S S H L S S S I N G L P Y                       | 200  |
| CCCTCACGGCTGATGGCATGACTTTGCAGGATTTGAAAGAAGTCTCTGTTTCAGGATCTG  | 660  |
| P S R P D G M T L Q D L K E V S V Q D L                       | 220  |
| GAACGTTGGAGAGACAGAATCTCTGATGCTATCCACATAGGCCACGTGGAAGACGAAAAT  | 720  |
| E R W R D R I S D A I H I G H V E D E N                       | 240  |
| GGATCACACGTGCCATTAGATGACACACGAGGTATTGACATTTTAGGGGCCATGGTTGAA  | 780  |
| G S H V P L D D T R G I D I L G A M V E                       | 260  |
| GCTAGTTATGAATCAATCAACCAAGCATTCTATGGTAGCATCCATAACTGGGGTCACGTG  | 840  |
| A S Y E S I N Q A F Y G S I H N W G H V                       | 280  |
| ATCTCAGCAGGGTCCTAGATCCCGATGGTCGTTACCATTTGAATCCAGGTGTGATGAGC   | 900  |
| I S A R V L D P D G R Y H L N P G V M S                       | 300  |
| GATACTGCTACCTCCCTCAGAGATCCCATCTTCTACCGATGGCATAGATTCATTGATAAT  | 960  |
| D T A T S L R D P I F Y R W H R F I D N                       | 320  |
| ATGTTCCAGGATTACAAAGAGACTTTGCCACATTACAACCATTCAGACCTCGAATTCCCA  | 1020 |
| M F Q D Y K E T L P H Y N H S D L E F P                       | 340  |
| GGTATTGAAATAACCAAAGTCCTTCTGAACGCTGAACACACGAACAACATCAACACCTTC  | 1100 |
| G I E I T K V L L N A E H T N N I N T F                       | 360  |
| AAGGAGTTTTTCAGTGTGGATCTCTCACATGCTTACGAATTTGGCAGAGATGGAGCCGTC  | 1160 |
| K E F S V L D L S H A Y E F G R D G A V                       | 380  |
| AAGGTTTCGGTTCAGTCACTTGAACCACGAGGATTTCCACTACAAGATTCAGGTTGAAAAC | 1220 |
| K V R F S H L N H E D F H Y K I Q V E N                       | 400  |
| CACACTAGCAAAACAAAGCCTGCAACCGTTCGTATTTTATGGCACCCAAGTACGATGAG   | 1280 |
| H T S K T K P A T V R I F M A P K Y D E                       | 420  |
| CTAGGCAACGAATTGGATACCAAGAAGTTGCGTCGTCATGATTGAAATGGACAAGTTT    | 1340 |
| L G N E L D T K N L R R L M I E M D K F                       | 440  |
| CATGCAGAAATTCATCCTGGCCACAACACTATTGTTTCGCCACTCTAAAGACTCTAGTGTG | 1400 |
| H A E I H P G H N T I V R H S K D S S V                       | 460  |
| ACCATTTTCGTCTGCACGAAGCTTTGGACAGTTGGCTCATGGCGAAGGGATTAACGAACAT | 1460 |
| T I S S A R S F G Q L A H G E G I N E H                       | 480  |
| GCTAATGAATATTGTAGCTGTGGATGGCCAGACCATTTACTGGTCCCACGTGGTGACGAA  | 1520 |
| A N E Y C S C G W P D H L L V P R G D E                       | 500  |
| AAAGGCATGCCTTTTCACTTGTTCGTAATGTTAACCGACTGGCTTCATGATCAGGTTGGT  | 1580 |
| K G M P F H L F V M L T D W L H D Q V G                       | 520  |
| GACCACGGCAAGACAGGGATGTGTACTGACGCAGTAAGCTACTGCGGGGCCAAAGATCAG  | 1640 |
| D H G K T G M C T D A V S Y C G A K D Q                       | 540  |
| CTTTACCCAGACCGACCTATGGGCTTCCCGTTTCGATAGACACATCGAACTAGAACAT    | 1700 |
| L Y P D R R P M G F P F D R H I E L E H                       | 560  |

|                                                                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| CTCAAGGATTGGGTACTTCCTAACATGAAGGACACTCTGATCACTGTAACACATCACGAG          | 1760 |
| L K D W V L P N M K D T L I T V T H H E                               | 580  |
| GAGGTTCAACAACCATAACCAC <b>TAAAAA</b> TGTAACCTAAGATATTTCTTTCTGTAGTTAAT | 1820 |
| E V H N H N H                                                         | 587  |
| GGTTTCAAATTTCCATTAAACAATAACATTTTTTCGAGATATGCTTTAAACAGTTAAACATG        | 1880 |
| AATTTTAATATGAACATGTTTTGGCAATGTAATACTACTGGCAATTTAAAGTAGTACAT           | 1940 |
| GTTATTCAAATAAAGATATGAAACTAGGCTCTGGGACTATATCGAATGCATGGTTGTAAC          | 2000 |
| GACGTTTAATAATATAAATGA <b>AATAA</b> GTTATCTTTAAACTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAA | 2060 |
| AA                                                                    | 2062 |

**Abb. 3.11:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) der Hämocyaninuntereinheit V oder VI von *L. polyphemus*.

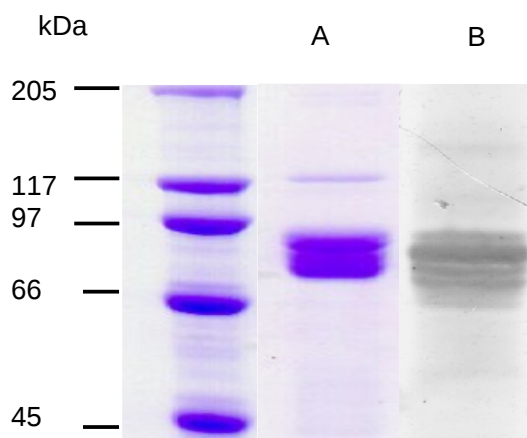
Am 5'-Ende fehlen etwa 150 Basenpaare. Daher fehlen Startcodon und Signalpeptid. Die Histidine, welche mit den Kupferionen der Sauerstoffbindungsstelle koordiniert sind, wurden blau markiert. Stopcodon sowie das Polyadenylierungssignal sind grün gefärbt.

### 3.3 Hämocyanine der Crustaceen

Innerhalb der Crustaceen sind mittlerweile eine große Anzahl von Hämocyaninen bei den dekapoden Krebsen nicht nur immunologisch und proteinbiochemisch untersucht (Markl, 1986; Markl und Decker, 1992) worden, es liegen auch einige Sequenzdaten vor (z.B. Sello et al., 1997; Kusche und Burmester, 2001; Kusche et al., 2003). Außerhalb der Dekapoda sind die Daten noch spärlich. Mit dem zu den Amphipoden gehörenden *Gammarus roeseli* sollte daher ein nichtdekapoder Vertreter der malakostraken Crustaceen auf das Vorhandensein von Hämocyanin untersucht werden.

#### 3.3.1 Charakterisierung des Hämocyanins von *Gammarus roeseli*

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bereits eine Charakterisierung der Hämolymphe von *G. roeseli* in Form eines Coomassie-gefärbten SDS-Gels und eines Western-Blots (Abb. 3.12) erfolgt. Darüber hinaus existierte eine cDNA-Bank, die auch schon innerhalb der Arbeitsgruppe mittels Antikörperscreening durchmustert worden war. Leider konnten hierbei keine vollständigen Klone gefunden werden, sondern nur Fragmente. Vor allem die fehlenden 5'-Enden der cDNA stellten ein Problem dar.



**Abb. 3.12:**  
SDS-PAGE mit der Hämolymphe von *Gammarus roeseli*. Coomassiefärbung (A) und Western-Blot (B).  
Im Western-Blot erkennbar sind mindestens sechs verschiedene Hämocyaninuntereinheiten.  
(Hembach, 2002)

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, ausgehend von bereits bekannten Sequenzfragmenten mit Hilfe einer 5'-RACE ein cDNA-Teilstück am 5'-Ende zu ermitteln. Leider war es nicht möglich, dieses 5'-Ende einer vollständigen Sequenz sicher zuzuordnen. Die cDNA-Sequenz, die in Abb. 3.13 gezeigt wird, ist daher aus vier unterschiedlichen Fragmenten zusammengesetzt, die in den überlappenden Bereichen identisch waren (das vollständige

Alignment ist dem Anhang unter 7.10.1 zu entnehmen). Sie besteht aus 675 Aminosäuren. Die Translation resultiert in einem (theoretisch berechneten) Protein mit einer Molekülmasse von 75 kDa ( $pI = 5,3$ ). Es existiert ein Signalpeptid am 5'-Ende, das 15 Aminosäuren umfasst.

### Hämocyanin von *G. roeseli*

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| <u>MKLLLLCLAATSAFAWPSFFNDAAPSI</u> AVRQQAVNHLLYRVTEPLRFDDLKAVAASFNPV | 60  |
| ADKSIYTDGGVAAQHLVDELTDHRLLEKHHWFSLFNTRQREEALMLFDVLIHSKTWETAL         | 120 |
| NNAAYFREQMNEGEFVYALYA AVIHSKLGAGIVLPPLYEVTPLFTNSEVIQKAYNAQMT         | 180 |
| QTPGSFKQDFTGSKKNPEQRVAYFGEDIGMNVHVTWHLDFPFWWEDSYGYHLDRKGELF          | 240 |
| FWAHQLTARFDAERLSNHLDLVDELYWDRPIKEGFAPHATYRYGGEFPTRPDNVHFEDV          | 300 |
| DGVVRVRDMIIHETRIKGAIAHGYITAADGSHININDEHGIDHLGDIIESSLYSPNAQYY         | 360 |
| GALHNEAHIIILGRQADPHGKFNLPSPVMEHFETATRDPAFFRLHKYMDNMFKEHKDSLAP        | 420 |
| YTAAEIGFPGVHLTSVSIEGELETFFEDFEYDLKMAVDSSEAVAEEVKAHVDRNLNKKDF         | 480 |
| AYNFDIKSDSADQHAVVRVVRVFLCPRRDNNGIQFTFDEGRWNCIEMDKFWTKLAAGDNH         | 540 |
| IKRKSSSESVTVPDVPSFASLIHDADA AVASGSDLHLEEFDRACGLPQRMLLPKGTEEGL        | 600 |
| EFLLVAVSDGTTDAQHDALEAVDAHGHACG VNGEKYPDHQPMGFPLDRRIPDDRIFLS          | 660 |
| ADNIEKLLVTVTHKH                                                      | 675 |

**Abb. 3.13:** Aminosäuresequenz einer *G. roeseli* Hämocyaninuntereinheit.

Die Sequenz wurde aus verschiedenen cDNA-Sequenzen zusammengefügt. Ob es sich dabei um eine einzige Hämocyaninuntereinheit handelt, ist unklar. Die Sequenz am 5'-Ende ist diejenige, die im Rahmen dieser Arbeit gefunden werden konnte (violett markiert). Das putative Signalpeptid ist unterstrichen.

### 3.4 Hämocyanine der Insekten

Bislang wurde Hämocyanin, außer bei Insekten, bei Vertretern von allen Gruppen innerhalb der Arthropoda gefunden. Bei den Insekten ging man allerdings davon aus, dass sie kein Hämocyanin besitzen, da das Vorkommen eines gut entwickelten Trachealsystems diesen respiratorischen Blutfarbstoff überflüssig gemacht hatte (Mangum, 1985). Da in der embryonalen Hämolymphe von *Schistocerca americana* ein Protein (embryonales Hämolymphe Protein, EHP) nachgewiesen werden konnte, welches Ähnlichkeiten mit Arthropodenhämocyaninen aufwies (Sanchez et al., 1998), sollte im Rahmen der Arbeit geklärt werden, ob Insekten über ein funktionelles Hämocyanin verfügen. Dazu wurden verschiedene Vertreter insbesondere der basalen Insekten, auf das Vorhandensein dieses respiratorischen Proteins untersucht (Tabelle 3.1).

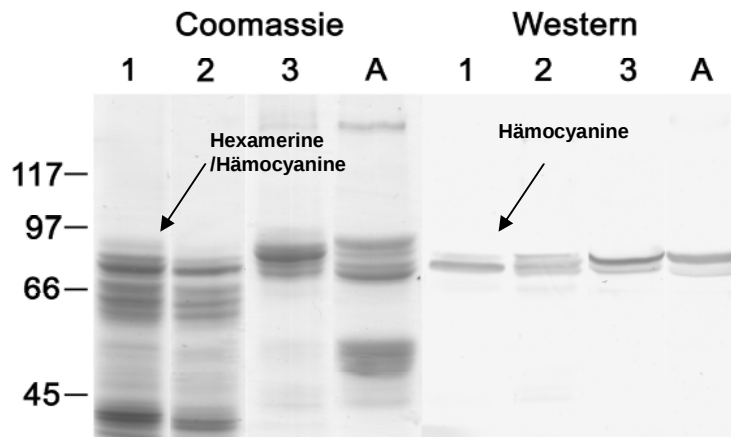
#### 3.4.1 Charakterisierung der Hämocyaninuntereinheiten von *Perla marginata*

Nachdem für alle Entwicklungsstadien von *P. marginata* (diese Steinfliegenart hat einen dreijährigen Entwicklungszyklus) im SDS-Gel mehrere Banden im Bereich zwischen 66 und 97 kDa auftraten (Abb. 3.14), wurden im Western-Blot diverse, gegen Crustaceen-Hämocyanin gerichtete Antikörper zur Detektion eingesetzt. Hierbei war es mit einem Antikörper gegen Hummerhämocyanin möglich, zwei Banden im Bereich von etwa 75 kDa zu identifizieren. In der Folge wurden aus vorhandenen Hämocyanin-Sequenzen (Vertreter der Crustaceen, Sequenz von *Schistocerca americana*) degenerierte Primer (siehe Anhang) hergestellt und eine RT-PCR auf die RNA von *P. marginata* durchgeführt. Daraus resultierte ein cDNA-Fragment von 1048 Basenpaaren, bei dem es sich eindeutig um Hämocyanin handelte. Mit Hilfe dieser Teilsequenz war es möglich, eine Sonde herzustellen, die in der Folge dazu benutzt wurde, eine Steinfliegen- cDNA-Bank zu durchmustern. Hierbei gelang es, zwei komplette Hämocyaninuntereinheiten (Abb. 3.17 und 3.18) zu identifizieren, die als Hc1 und Hc2 bezeichnet wurden (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2:** Vergleich der Hämocyaninuntereinheiten Hc1 und Hc2 der Steinfliege *P. marginata*:

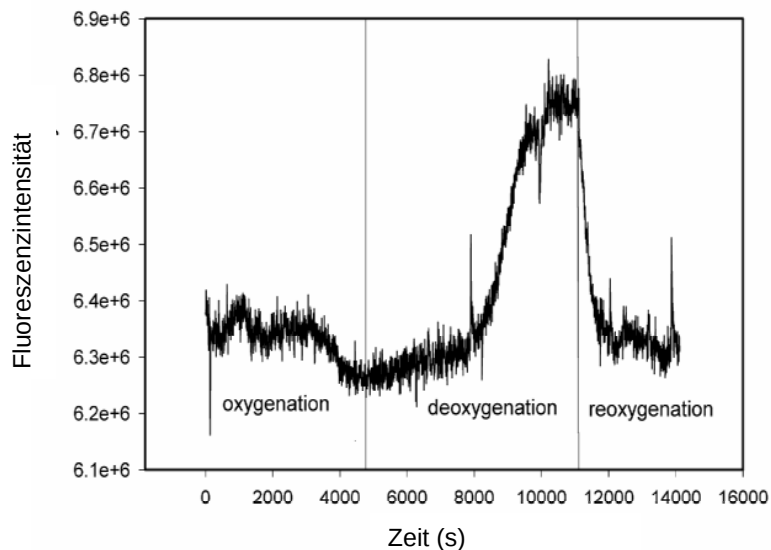
| Hämocyaninuntereinheit                     | Hc1       | Hc2       |
|--------------------------------------------|-----------|-----------|
| Länge in Basenpaaren                       | 2601      | 2367      |
| Länge in AS                                | 678       | 671       |
| Molekülmasse (kDa)                         | 77, 2     | 76,3      |
| pI                                         | 5,77      | 6,18      |
| Länge Signalpeptid (AS)                    | 19        | 16        |
| Zugangsnummer der EMBL / Genbank-Datenbank | AJ 555403 | AJ 555404 |

Zur weiteren Charakterisierung, und um nachzuweisen, dass es sich bei dem Hämocyanin von *P. marginata* um ein funktionelles respiratorisches Protein handelt, wurde das Sauerstoffbindungsverhalten der Steinfliegenhämolymphe untersucht. Wie Abbildung 3.15 zeigt, ist das Hämocyanin (untersucht an 3-jährigen Larven und adulten Tieren) zu einer reversiblen Sauerstoffbindung in der Lage. Im Folgenden wurde eine Sauerstoffbindungskurve der Hämolymphe erstellt (Abb. 3.16). Das Hämocyanin zeigte hierbei einen  $P_{50}$  von etwa 8 Torr mit einem Hill Koeffizienten von  $h = 2$  und damit eine deutliche Kooperativität. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, einen spezifischen Antikörper gegen das Steinfliegenhämocyanin herzustellen, der dazu benutzt werden sollte, weitere Insekten auf das Vorhandensein von Hämocyaninen zu untersuchen. Hierzu wurde zunächst mit Hilfe von spezifischen Primern ein 771 Basenpaare großes Fragment aus der cDNA der Hämocyaninunterheit 1 amplifiziert. Die Primer waren so gewählt, dass das Fragment neben einer Restriktionsschnittstelle für Kpn I auch eine solche für Hind III besaß. Durch Klonieren der cDNA in einen Expressionsvektor gelang es ein Protein von 257 Aminosäuren zu erhalten. Mit diesem Peptid wurde nun ein Kaninchen immunisiert (Charles River, Deutschland), welches polyklonale Antikörper gegen das Hämocyanin der Steinfliege produzierte. Mit Hilfe des so gewonnenen Serums konnten nun weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

**Abb. 3.14:**

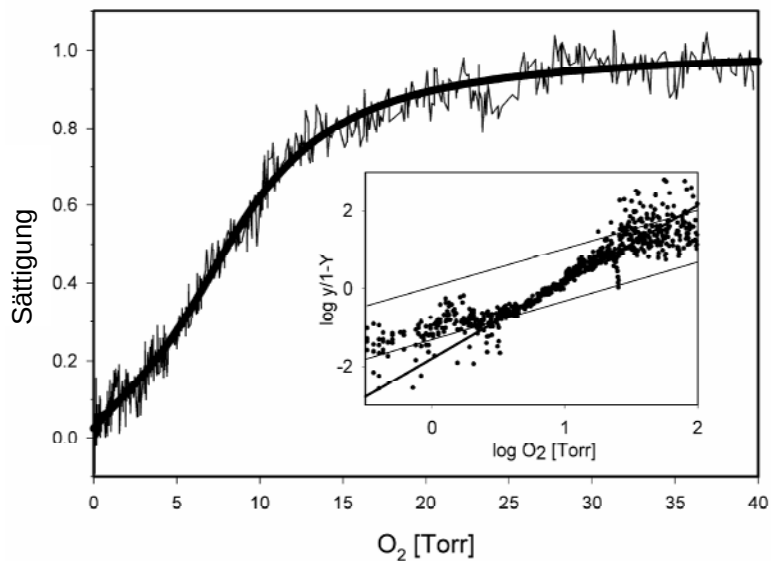
SDS-PAGE mit Hämolymphe von *Perla marginata* in verschiedenen Entwicklungsstadien (1-3 = Larvenstadien im Alter von 1-3 Jahren; A = adulte Tiere). Coomassiefärbung und Western-Blot

Im der Coomassiefärbung sind Hexamerine und Häemocyanine erkennbar, im Western-Blot sind die Häemocyanine mit einem spezifischen Antikörper detektiert.

**Abb. 3.15:**

Die Abbildung zeigt, dass das Häemocyanin von *Perla marginata* in der Lage ist, Sauerstoff reversibel zu binden.

Die Messung wurde am Institut für Biophysik in der Arbeitsgruppe von Prof. Decker durchgeführt.

**Abb. 3.16:**

Sauerstoffbindungskurve der Hämolymphe von *Perla marginata*. Die Hämolymphe zeigt Kooperativität (Hill- Koeffizient = 2,0) und eine mittlere Sauerstoffaffinität mit einem  $P_{50}$  von etwa 8 Torr.

Die Messung wurde am Institut für Biophysik in der Arbeitsgruppe von Prof. Decker durchgeführt.

## Hämocyanin 1

|     |                                                               |     |
|-----|---------------------------------------------------------------|-----|
|     | GTGAGGTACAGACGGCGCC                                           | 19  |
| ATG | AAGTGGTTATTGACCTTGGGACTGGTGATGGTGTGGCTAGCCTGGCTCAGGCTAAG      | 79  |
| M   | K W L L T L G L V M V L A S L A Q A K                         | 20  |
|     | CTTACAAGGGGATCCGTGCCAGCTGACCAAGACTTCCTCACCCGTCAACGCGATGTCATC  | 139 |
|     | L T R G S V P A D Q D F L T R Q R D V I                       | 40  |
|     | AGGCTGTGCATGAAGTCCATGAACACAATCATTACCAAGAGCAGGTCGACCTTGTC AAG  | 199 |
|     | R L C M K V H E H N H Y Q E Q V D L V K                       | 60  |
|     | GACTATGATCCCAGCGTCGCCGGAAGTTCAAGGATGTCCTCCCATCAAGAGGTTGATG    | 259 |
|     | D Y D P S V A G K F K D V T P I K R L M                       | 80  |
|     | AAGTACTACAACGCTAAGACACTTCTTCCCCGTGGAGACATCTTCTCTGTTCACAAG     | 319 |
|     | K Y Y N A K T L L P R G D I F S L F H K                       | 100 |
|     | GAACATCGCGAAGAGATGATCTTGTGTTTGAGTCCTTCTGTTTCGCTCAGGACTGGGAT   | 379 |
|     | E H R E E M I L L F E S F L F A Q D W D                       | 120 |
|     | ACTTTCTTCAAGACAGCTGTCTGGGCCAGAGACAGGATCAACGAGGGACAGTTTGTGTAC  | 439 |
|     | T F F K T A V W A R D R I N E G Q F V Y                       | 140 |
|     | GCCCTTAGTGTGGCTGTCTCCACCGTGAAGACTGCAAGGGTATCATTCTTCCCCAGCC    | 499 |
|     | A L S V A V L H R E D C K G I I L P P A                       | 160 |
|     | TATGAGATCTACCCTCACATGTTTGTCAACAGTGAAGTCATCAACTCTGCCTACAAGGCA  | 559 |
|     | Y E I Y P H M F V N S E V I N S A Y K A                       | 180 |
|     | AAGATGACCCAGACCCCAGCCATCATCCACATGAACCTTACAGGAACATCAGGAACCCC   | 619 |
|     | K M T Q T P A I I H M N F T G T I R N P                       | 200 |
|     | GACCAATGGATCGCCTACCTTGGAGAAGATGTTGGTCTCAACTCCCATCACGCTCACTGG  | 679 |
|     | D Q W I A Y L G E D V G L N S H H A H W                       | 220 |
|     | CACATGGACTTCCCCTTCTGGTGGAAGGCTGCAGAGTACGGCATTGAGAAGGACCGCAAG  | 739 |
| H   | M D F P F W W K A A E Y G I E K D R K                         | 240 |
|     | GGAGAGCTGTTCTATTACATGCACCACAGATGATCGCCGATACGACTTTGAGCGTCTC    | 799 |
|     | G E L F Y Y M H Q M I A R Y D F E R L                         | 260 |
|     | TCCAACCTGGCTGCACTTCGTTGAGCCCATCTCCTTTGAAGACGAGATCGAGCATGGTTTC | 859 |
|     | S N W L H F V E P I S F E D E I E H G F                       | 280 |
|     | TACCTCAGACCACCTACAGGGTTGGCGGTGAATCCAGCCAGGCCTGACAACTTCCAC     | 919 |
|     | Y P Q T T Y R V G G E F P A R P D N F H                       | 300 |
|     | TTCCATGACCTGGAGCACATCAAGATCAAGGACATGCTTGACTACACCCGTAGGATCAAG  | 979 |
|     | F H D L E H I K I K D M L D Y T R R I K                       | 320 |

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| GAGGCCATCTCCAAGCAAAAAGTCCGTTCCAAGAACGGTGAGAAAATTCCTCTTGACGCT  | 1039 |
| E A I S K Q K V R S K N G E K I P L D A                       | 340  |
| GTCCACGGTATCGACATTCTTGAGACCTGATGGAGCCTTCCGTAGAGAGCCCTCATGAG   | 1099 |
| V H G I D I L G D L M E P S V E S P H E                       | 360  |
| GACTACTATGGTTCCCTGCACAACGACGCTCACGTACTTCTGGGTCAAATCACCGATCCT  | 1159 |
| D Y Y G S L H N D A H V L L G Q I T D P                       | 380  |
| CTCGAAAGTTTCGATCTGCCCCAGGTGTAATGGAGCACTTCGAGACCGCTACCAGAGAC   | 1219 |
| L G K F D L P P G V M E H F E T A T R D                       | 400  |
| CCTGCCTTCTTCCGCCTTCAAGCACATTGACAACCTTATTCAAGATGTACAAGGACCTG   | 1279 |
| P A F F R L H K H I D N L F K M Y K D L                       | 420  |
| CTGCCTCCTTACACCAAGGCTGAGCTGGAGTTCCCTGGAGTGAAGGTTCTGGACTGGGAG  | 1339 |
| L P P Y T K A E L E F P G V K V L D W E                       | 440  |
| ATCGTAATCTGGTCACCTACTTTGAGGATTTGATATCGATATGTTGAACGCTCTCGAC    | 1399 |
| I G N L V T Y F E D F D I D M L N A L D                       | 460  |
| GACACCGCCGATCTTCTGATGTGACGTCAAGGCTCGTGTGACGCTCTGAACCACGAA     | 1459 |
| D T A D L P D V D V K A R V Q R L N H E                       | 480  |
| CCTTTCACCTGGGCCCTGCACATGGAGAGTGACAAGGAGGTGACCGCCGCCTTCCGTGTC  | 1519 |
| P F T W A L H M E S D K E V T A A F R V                       | 500  |
| TTCCTCGGACCAAAGAAAGACTGGTACGAAAGTGACTTCACCATTAAACGAAGTCAGACCC | 1579 |
| F L G P Y T K K D W Y E S D F T I N E V R P                   | 520  |
| TACCTCATCGAGATCGACAAGTTTCGTCACAAAGTTGTGGCCGGCAAGTCTGTGATCCAC  | 1639 |
| Y L I E I D K F V T K V V A G K S V I H                       | 540  |
| CGCAAGTCCAGCGAATCTAGTGTGACCATCCCCGACCGTGAGACCACCAAAGTTCTTCTG  | 1699 |
| R K S S E S S V T I P D R E T T K V L L                       | 560  |
| GAGAAGGTTGAGCAGCCCTGGAGGGCAAGGAAACCTGAACGTAAACAAGGATGAGCGC    | 1759 |
| E K V E H A L E G K E T L N V N K D E R                       | 580  |
| CACTGTGGCTACCCCGACCGCTGCTGTTGCCCAAGGGCAGGAATACTGGTATGCCCGTC   | 1819 |
| H C G Y P D R L L L P K G R N T G M P V                       | 600  |
| CAGATCTACGTATTGTACCGACTTTGAGAAGGAGAAGGTGAACGACCTGCCCTACGAT    | 1879 |
| Q I Y V I V T D F E K E K V N D L P Y D                       | 620  |
| TACGACTACGGCGTTTCTCTCAGCTACTGCGGTGTTGTTGGAGGTCACAAGTACCCCGAC  | 1939 |
| Y D Y G G S L S Y C G V V G G H K Y P D                       | 640  |
| ACCAAGGCCATGGGATTCCCCTTCGACCGTCGCATTTACTCAAGGGAGGACTTCTTCACC  | 1999 |
| T K A M G F P F D R R I Y S R E D F F T                       | 660  |
| GACAACATGTATACGAAGGACGTCACCATCACCTTCAAGGAGAACCACCACCATTA      | 2059 |
| D N M Y T K D V T I T F K E N H H H                           | 678  |
| AACAGGTGCTTCACACCTGTCTCCAACAAAATCAACAGGTGCAAACTCTGCAAACT      | 2119 |
| GCAAGAAACCTCACATTCTCTGGACAACCTAACAGAGGATCACCTGTTGGTCTTGATCAA  | 2179 |
| CTCGACACCTGTTTACAACCATAAACAGTCTGTAACGCTCAACAGGTGCACACCTGTTGT  | 2239 |
| TAATGTTCAACAAGTACTTGTGAGCTCTCAACAGGTACACACTTGTACCCAACTTCCA    | 2299 |
| ACAGGTTCACTTTTATCTACCTCCCTTACATGCAAAGCTATCAATAATACTTCCAATATC  | 2359 |
| CTACCAACAGTCCTAACAATCCTTCATAAACAAGGTCTTTTAAATACAATTGCTCAAA    | 2419 |
| CTTGATACAATCAATTTACCAAGGAACACAAAATCGTTAGCGTTAATGATATTTGTTAAA  | 2479 |
| TTATTTCTTTGCTTGTTCATTTGTTGAATCTGTAACACACCTCTCTAATGTAATATTT    | 2539 |
| ACGTTCTGATGTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA     | 2599 |
| AA                                                            | 2601 |

**Abb. 3.17:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) von *Perla marginata* Hc1. Das Startcodon ist rot markiert, das putative Signalpeptid unterstrichen. Die Histidine, welche mit den Kupferionen der Sauerstoffbindungsstelle koordiniert sind, wurden blau markiert. Stopcodon sowie das Polyadenylierungssignal sind grün gefärbt.

## Hämocyanin 2

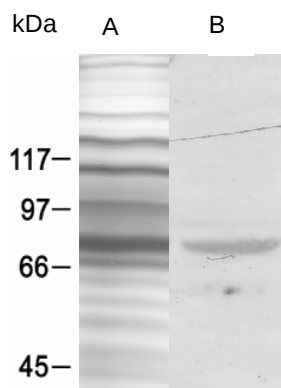
|                                                               |                                                            |      |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------|
|                                                               | GTCTTCTCCTGCAGGT                                           | 16   |
| ATG                                                           | AAGTTTCGCTTTGGTTTTGATTGGGCTTTGCGCCCTGGCAGCTGCAGATACTGTTGAC | 76   |
| <b>M K F A L V L I G L C A L A A A</b>                        | <b>D T V D</b>                                             | 20   |
| GATACCTTCTACAAGCACCAGACCCAAGTGCTGCACCTGGTGGAGCACATTTACGAACCC  |                                                            | 136  |
| D T F Y K H Q T Q V L H L V E H I Y E P                       |                                                            | 40   |
| ATCAGCTCCCACTATGAGGACCTCACCACCATTAAGAAGACCTACGACCCCTGCAACAT   |                                                            | 196  |
| I S S H Y E D L T T I K K T Y D P L Q H                       |                                                            | 60   |
| CTGGACAATTTCAAGGATGGCGATCACGTGAAGCACTTCGTTACGATGTCACCCACGGC   |                                                            | 256  |
| L D N F K D G D H V K H F V H D V T H G                       |                                                            | 80   |
| AAATACCTCGCTCACGATGAGATCTTCAACATCTTCCACCCTCATCACCGTCGTCAGATG  |                                                            | 316  |
| K Y L A H D E I F N I F H P H H R R Q M                       |                                                            | 100  |
| GTCTACTTGTTCGAGATCCTCTACGGAGCCAAGGACTTTGACAGCTTCTTCAACATGGCC  |                                                            | 376  |
| V Y L F E I L Y G A K D F D S F F N M A                       |                                                            | 120  |
| GTCTGGGCTAGGGATCACATGAGCCCCAGGATGTTCTGTACGCCTTCTCTGTTGCCGTC   |                                                            | 436  |
| V W A R D H M S P R M F L Y A F S V A V                       |                                                            | 140  |
| CTCCACCGTACTGACTGCAAGGGAATCACCTCCCCCTGCCTACGAGATCACCCCGAC     |                                                            | 496  |
| L H R T D C K G I T L P P A Y E I T P D                       |                                                            | 160  |
| ATGTTCTCACCAACCGATGTCATGAGGAAGGCCTACCAAGCCAAGATGACAGCGACAAAG  |                                                            | 556  |
| M F L T T D V M R K A Y Q A K M T A T K                       |                                                            | 180  |
| ACCGTCATTCCCATGAAGTTCACCGGCTCCATCAAGAACCCGAGCAGAGGGTCGCCTAC   |                                                            | 616  |
| T V I P M K F T G S I K N P E Q R V A Y                       |                                                            | 200  |
| TTCGGCGAGGACCTGGCGTCAACTCCCATCACTCCCACTGGCACATGGACTTCCCCTTC   |                                                            | 676  |
| F G E D I G V N S H <b>H</b> S H W <b>H</b> M D F P F         |                                                            | 220  |
| TGGTGGAAGAGGTCTATGACGTCACCAAGGATAGGCGAGGAGAACTGTTCTTCTACATG   |                                                            | 736  |
| W W K R S Y D V T K D R R G E L F F Y M                       |                                                            | 240  |
| CACCACCAGATGGTCAACCGTTTCGACGCTGAGCGACTCTCCAAGTGGCTTCCACAGGT   |                                                            | 796  |
| <b>H</b> H Q M V N R F D A E R L S N W L P Q V                |                                                            | 260  |
| GAGCCCCTGAACTGGCACCACGAGATTGAGGAGGGTTTCGCCCCAGCAGCCATGTACTTC  |                                                            | 856  |
| E P L N W H H E I E E G F A P A A M Y F                       |                                                            | 280  |
| AACGGCCAGNAATTCCTGAGACCTGACGGTATTCACTTCCACGACCTCCCCTGGTTT     |                                                            | 916  |
| N G Q E F P M R P D G I H F H D L P W F                       |                                                            | 300  |
| ACCGTCAAGGACACCGAGGATTACGAGGACAGGATCAGGAACGTCATCGCCAAGGGATAC  |                                                            | 976  |
| T V K D T E D Y E D R I R N V I A K G Y                       |                                                            | 320  |
| GTCAAGGCCAGCGATGGTCACACCATCTTCTGAATGGCACTGAGGGTATCAACATCCTG   |                                                            | 1036 |
| V K A S D G H T I F L N G T E G I N I L                       |                                                            | 340  |
| GGTCTGGTTGTTGAGTCCCTGGACCACGACTACAACCGTCACTACTTCGGCAAACCTCCAC |                                                            | 1096 |
| G L V V E S L D H D Y N R H Y F G K L <b>H</b>                |                                                            | 360  |
| TCCAACGCTCATGTCTGCTCTCCAAGGTCACCGACCTGAGCAGAAGTTTGGAACCTCCC   |                                                            | 1156 |
| S N A <b>H</b> V L L S K V T D P E Q K F G T P                |                                                            | 380  |
| CCAGGTGTGATGGAGCACTTTGAGACCGCTACCAGAGACCCTGCCTTCTTCCGCCTTCAC  |                                                            | 1216 |
| P G V M E H F E T A T R D P A F F R L <b>H</b>                |                                                            | 400  |
| AAGCACATTGACAACCTATTCAAGCAGCACAAGGACATGCTGACACCCTACACCAAGGAA  |                                                            | 1276 |
| K H I D N L F K Q H K D M L T P Y T K E                       |                                                            | 420  |
| GAGCTGGACTTCCCCGGAGTGACTGTTGACGCCGTCAAGGTCGTTGGCAAGAGCGAAGAC  |                                                            | 1336 |
| E L D F P G V T V D A V K V V G K S E D                       |                                                            | 440  |
| TCGACAGCCAATCAGATCGTCACCTTCTTTGACGAGTCGCACATCAACCTTGGAACATG   |                                                            | 1336 |
| S T A N Q I V T F F D E S H I N L G N M                       |                                                            | 460  |
| TGGGTCCACACCCCTGAGAAGGTCGGCATTGAGGTCAACATGAAGCGCCTGAACCACGAA  |                                                            | 1396 |
| W V H T P E K V G I E V T M K R L N H E                       |                                                            | 480  |
| GCCTTTAAGTACGTCATTACTGCCACCGCCGAGAAGGAAACCGAGGGTATCGTCCGCATC  |                                                            | 1456 |
| A F K Y V I T A T A E K E T E G I V R I                       |                                                            | 500  |
| TTCCTCAGCCCCACCTACAACCTGGTTCGGTCAGGAGATCACTCTTCAGGACGGACACTGG |                                                            | 1516 |
| F L S P T Y N W F G Q E I T L Q D G H W                       |                                                            | 520  |
| GGCGCGATTGAGATGGACCGCTTCCCCGTGAAGCTGACTGCTGGTGAGAACGTGATTACT  |                                                            | 1576 |
| G A I E M D R F P V K L T A G E N V I T                       |                                                            | 540  |

|                                                                |      |
|----------------------------------------------------------------|------|
| CGCTCTGGCAAGAAGTCTGTCGTCACCATTGATGAGCCCATGAGCTTCGCTGAGATCCAC   | 1636 |
| R S G K K S V V T I D E P M S F A E I H                        | 560  |
| AAGGCAGTGGCTGACAAGGACGCCACTCACTTCCACAAGGAGTTCCGCCACTGCGGCTTC   | 1696 |
| K A V A D K D A T H F H K E F R H C G F                        | 580  |
| CCCCACCGACTGCTGGTCCCCAAGGGCCGCCCGAGGGAATGCACTACAAGCTGATGGTG    | 1756 |
| P H R L L V P K G R P E G M H Y K L M V                        | 600  |
| GTCATCACCGACTATCACAAGGATGTCGTCGTCCTGACATGGACGTCGAGCACATGGAC    | 1816 |
| V I T D Y H K D V V V P D M D V E H M D                        | 620  |
| AAGCTTCAGTCTGTGGGATACTGTGGTGTCATGGAGGGCAAGATTCCCGACGGCAAACCC   | 1876 |
| K L Q S V G Y C G V M E G K I P D G K P                        | 640  |
| ATGGGATACCCCTTCGACCGTCGCATCTCCTGCGAGGAGAGCTTCATAACCAAGAACATG   | 1936 |
| M G Y P F D R R I S C E E S F I T K N M                        | 660  |
| AAGTTCGTCGACATCACCGTCAAGACCAGGGTCTGA                           | 1996 |
| K F V D I T V K T R V                                          | 671  |
| TTCATTGACTTCAACATTAATTGACATTGTAAGATAATTAACACATATCATCATTCCAAT   | 2056 |
| TAAAAATAAACTTTTCGAGAATACATTTTCGCTTTATTTTTATGTAAATTGTTGTAATAA   | 2116 |
| TTAATCAAATCTGGAAACATTAATCGATAAAAACTAAAACTGTATAAAATTGGAAAATTG   | 2176 |
| AAAGTAGAGAAACAAATGTTTCATTCTATGAAACAATGATTTTGTAAATAATACTTCGATAG | 2236 |
| TTTAGTAATTTAATTGAATAAAAGTAACAACCAAAAGTGTTAAATATTATTCAGGAACG    | 2296 |
| CACAAATTTTCTTAACACGTAAACTTTCAAAAATAA                           | 2356 |
| AAAAAAAAAA                                                     | 2367 |

**Abb. 3.18:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) von *P. marginata* Hc2. Das Startcodon ist rot markiert, das putative Signalpeptid unterstrichen. Die Histidine, welche mit den Kupferionen der Sauerstoffbindungsstelle koordiniert sind, wurden blau markiert. Stopcodon sowie das Polyadenylierungssignal sind grün gefärbt.

### 3.4.1 Charakterisierung der Hämocyaninuntereinheiten von *Thermobia domestica*

Nachdem bei *P. marginata* Hämocyanin gefunden wurde, war es naheliegend, zunächst innerhalb der basalen Insekten nach weiteren Arten zu suchen die ebenfalls über ein solches verfügen könnten. Ein möglicher Vertreter war der Ofenfisch *T. domestica*, ein Mitglied der Ordnung der Thysanura (Borstenschwänze). Nachdem mit Hilfe des Antikörpers gegen das Steinfliegenhämocyanin eine Bande mit der für Hämocyanin zu erwarteten Masse von ca. 75 kDa detektiert werden konnte (Abb. 3.19), wurden degenerierte Primer aus einem konservierten Bereich der Hämocyanin-Sequenzen von *P. marginata* konstruiert. Mit diesen wurde eine RT-PCR auf die Gesamt-RNA von *T. domestica* durchgeführt. Das Ergebnis waren zwei cDNA-Sequenzen, die jeweils 540 Basenpaare umfassten und im Alignment die größte Übereinstimmung mit den Sequenzen der Hämocyaninuntereinheiten Hc1 bzw. Hc2 von *P. marginata* aufwiesen. Da die verwendeten Primer im Bereich der konservierten Sauerstoffbindungsstellen (CuA und CuB) lagen, waren von den sechs koordinierten Histidinen nur fünf in den Sequenzen vorhanden (Abb. 3.20; 3.21). Um zu weiteren Ergebnissen zu gelangen, wurde eine cDNA-Bank aus der mRNA von etwa 20 Ofenfischen hergestellt, die dann sowohl mittels Antikörper gegen das Steinfliegenhämocyanin durchmustert wurde, als auch mit einer spezifischen Sonde aus der Sequenz der Hämocyaninuntereinheit 1. Leider brachte diese Vorgehensweise keine weiteren Ergebnisse. Auch der Versuch, das 5' bzw. 3' Ende mit Hilfe einer RACE-Reaktion zu vervollständigen misslang.



**Abb 3.19:**  
Coomassiefärbung (A) und Western-Blot (B) einer SDS-PAGE mit der Hämolymphe von *T. domestica*, inkubiert mit einem Antikörper gegen Hämocyanin von *P. marginata*.

## Partielle Sequenz des Hämocyanins 1

|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| TGGCATATGGATTTTCTTTTGGTGGAACCCGAGTACGGAGTGGAGAAGGACAGGAAG     | 60  |
| W H M D F P F W W K P E Y G V E K D R K                       | 20  |
| GGAGAACTTTTCTATTACATGCATCATCAGCTTATTGCAAGATTGCACTTGGAGAGATTA  | 120 |
| G E L F Y Y M H H Q L I A R F D L E R L                       | 40  |
| TCGAACAACCTTGCCAGTGGTAAGGCCTTTGGATTGGGAGAAACCAATTGTAAATGGATTC | 180 |
| S N N L P V V R P L D W E K P I V N G F                       | 60  |
| TACCCACAGACTACGTACAGGAAGGGTGGAGAATTCCCTGCTCGCCAGACAACCTTCTAC  | 240 |
| Y P Q T T Y R K G G E F P A R P D N F Y                       | 80  |
| TTCCAGGACCTGGAAACACCATACATCAAAGTGAAGCACATGATCGCCTACTCCCAGAGA  | 300 |
| F Q D L E T P Y I K V K H M I A Y S Q R                       | 100 |
| ATCAGAGAAGCCATCGCTAGAGGAGTTGTTTTAACGAAATCTGGAGAACCTTATTCCATC  | 360 |
| I R E A I A R G V V L T K S G E L Y S I                       | 120 |
| AACGATACTACAGGGATCAACACTTTGGGTGAATTGATCGAACCTTCTGTGTTCTCTCGC  | 420 |
| N D T T G I N T L G E L I E P S V F S R                       | 140 |
| CATCGAGAATATTATGGAGCTTTGCACAACATATGGACATATCCTTCTCGGCAGAATTACC | 480 |
| H R E Y Y G A L H N Y G H I L L G R I T                       | 160 |
| GACCCCAAGGGCAAGTTCAACATGCCACCTGGTGTAAATGGAGCACTTCGAAACAGCAACA | 540 |
| D P K G K F N M P P G V M E H F E T A T                       | 180 |

**Abb. 3.20:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) von *T. domestica* Hc1.

Am 5'-Ende fehlen etwa 750 Basenpaare, am 3'-Ende etwa 900 Basenpaare. Daher fehlen neben Startcodon und Signalpeptid auch Stopcodon und Polyadenylierungssignal. Die Histidine, welche mit den Kupferionen der Sauerstoffbindungsstelle koordiniert sind, wurden blau markiert (das erste Histidin der CuA-Bindungsstelle, sowie das letzte Histidin der CuB-Bindungsstelle fehlen).

## Partielle Sequenz des Hämocyanins 2

|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| TGGCATATGGATTTTCCGTTTTGGTGGAAGCCCGAATATGGAGTGGAGAAAGATAGGAAA  | 60  |
| W H M D F P F W W K P E Y G V E K D R K                       | 20  |
| GGAGAACTTTTCTATTACATGCATCATCAACTTATTGCAAGGTTTGATGCCGAGCGTCTG  | 120 |
| G E L F Y Y M H H Q L I A R F D A E R L                       | 40  |
| TCTAACTACTTGCCTGTGGTCGAACCATTGGACTGGGAGAAACCAATCGTTCAGGGATTT  | 180 |
| S N Y L P V V E P L D W E K P I V Q G F                       | 60  |
| GCACCAAGGAGCTATGTATGAGAATGGGCAGGAATTCCCAGTTCGTCCAGATAACATGAAT | 240 |
| A P G A M Y E N G Q E F P V R P D N M N                       | 80  |
| TTCCATGATCTTCCGTGGTTGACCATCGAAGATATGAAAGGATATGAAGACAGAATCAGG  | 300 |
| F H D L P W L T I E D M K G Y E D R I R                       | 100 |
| GACGCTATTGCCTCAGGATTCGTCATTTCCGTTGATGGTAGTCTTGTGTAATTGAATGAC  | 360 |
| D A I A S G F V I S V D G S L V Y L N D                       | 120 |
| ACCAGAGGTATTGATGTTCTTGGAGCTGTTATTGAATCTTCTGAACACAGCCAAAATAAG  | 420 |
| T R G I D V L G A V I E S S E H S Q N K                       | 140 |
| GAACTCTATGGTTCCTCCATAATAATGCCACGTCCTCCTGGGAAAAGTTACTGATTAC    | 480 |
| E L Y G S L H N N A H V L L G K V T D Y                       | 160 |
| AGCCTTAAATATGGGCTTCCACCTGGTGTGATGGAGCACTTCGAA                 | 525 |
| S L K Y G L P P G V M E H F E                                 | 175 |

**Abb. 3.21:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) von *T. domestica* Hc2.

Am 5'-Ende fehlen etwa 750 Basenpaare, am 3'-Ende etwa 900 Basenpaare. Daher fehlen neben Startcodon und Signalpeptid auch Stopcodon und Polyadenylierungssignal. Die Histidine, welche mit den Kupferionen der Sauerstoffbindungsstelle koordiniert sind, wurden blau markiert (das erste Histidin der CuA-Bindungsstelle sowie das letzte Histidin der CuB-Bindungsstelle fehlen).

### 3.4.3 Übersicht der auf Hämocyanin untersuchten Insektenspezies

Mit Hilfe des Antikörpers gegen das Hämocyanin der Steinfliege *Perla marginata* wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere Insektenspezies untersucht. Dies erfolgte zunächst durch die Auftrennung der Hämolymphe auf einem SDS-Gel, gefolgt von einem Western-Blot mit dem spezifischen Antikörper gegen das Steinfliegenhämocyanin. Bei einigen untersuchten Spezies waren dabei Banden in der richtigen Größe erkennbar, die aber über eine RT-PCR mit degenerierten Primern nicht verifiziert werden konnten. Schwerpunkt der Untersuchung lag hierbei auf basalen Insekten. Außer bei der Steinfliege und dem Ofenfisch konnte Hämocyanin bei keiner weiteren Art sicher nachgewiesen werden.

**Tabelle 3.1:** Übersicht über die untersuchten Insektenspezies

| Spezies                  | RT-PCR           | Western-Blot | Bereits bekannt?                                |
|--------------------------|------------------|--------------|-------------------------------------------------|
| Collembola, Adult        | nicht untersucht | Negativ      |                                                 |
| Ephemeroptera, Larve     | Negativ          | Fraglich     |                                                 |
| Zygentoma, Adult         | Positiv          | Positiv      |                                                 |
| Odonata, Larve           | Negativ          | Fraglich     |                                                 |
| Plecoptera; Larve, Adult | Positiv          | Positiv      |                                                 |
| Orthoptera, Adult        | nicht untersucht | Negativ      |                                                 |
| Orthoptera, Embryo       |                  |              | Positiv (Sanchez et al. 1998)                   |
| Phasmida, Adult          | nicht untersucht | Negativ      |                                                 |
| Dermaptera, Adult        | nicht untersucht | Negativ      |                                                 |
| Blattodea, Larve, Adult  | Negativ          | Fraglich     |                                                 |
| Hemiptera, Adult         | nicht untersucht | Negativ      |                                                 |
| Coleoptera, Adult        |                  |              | Negativ (Genbank NCBI)                          |
| Hymenoptera, Adult       | nicht untersucht | Negativ      |                                                 |
| Diptera, Larve, Adult    |                  |              | Negativ (Adams et al., 2000; Holt et al., 2002) |
| Trichoptera, Larve       | Negativ          | Fraglich     |                                                 |
| Lepidoptera              |                  |              | Negativ (Genbank NCBI)                          |

### 3.5 Hexamerine der Insekten

Hexamerine waren bisher bei allen untersuchten Spezies innerhalb der Insekten nachweisbar. Sie liegen in der Hämolymphe von Insektenlarven in z.T. sehr hoher Konzentration vor, was sich aus ihrer Funktion als Energie- und Eiweißspeicher während Zeiten ohne Nahrungsaufnahme erklärt (Telfer und Kunkel, 1991). Da es im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungen war, in einigen Insekten Hämocyanine zu finden, sollte geklärt werden, ob diese gleichzeitig mit Hexamerinen in der Hämolymphe vorkommen.

#### 3.5.1 Die Hexamerine von *Perla marginata*

In der SDS-PAGE, die mit der Hämolymphe von *P. marginata* durchgeführt worden war, konnten neben den Hämocyaninbanden noch weitere Banden beobachtet werden. Bei diesen Proteinen, die ebenfalls Molekülmassen zwischen 66 und 97 kDa aufweisen, handelte es sich um Hexamerine, die von dem spezifischen Antikörper gegen Hämocyanin nicht detektiert worden waren (Abb. 3.14). Es sollte im Rahmen der Arbeit versucht werden, diese Hexamerine auf Sequenzebene zu finden. Da Hexamerinteilsequenzen von anderen Steinfliegenarten vorlagen (die cDNA-Sequenzen wurden uns freundlicherweise von Dr. James Marden, Pennsylvania State University, zur Verfügung gestellt), war es möglich, aus diesen degenerierte Primer herzustellen, die dann in einer RT-PCR eingesetzt wurden. Auf diese Weise gelang es, Teilstücke von vier unterschiedlichen Hexamerinen zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren. Aus diesen Sequenzen wurden Dig-gelabelte DNA-Sonden hergestellt, die zum Durchmustern der Steinfliegen cDNA-Bank auf Hexamerine verwendet wurden. Hierbei konnte die vollständige cDNA des Hexamerins 1 (Hx1) der Steinfliege aufgeklärt werden (Abb. 3.22), welches sich in ein natives Protein mit 702 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 81 kDa translatieren lässt ( $pI = 5,68$ ). Die Sequenz verfügt, wie auch die Hämocyanine der Insekten, über ein Signalpeptid, welches hier 16 Aminosäuren umfasst. Die Hexamerine 3 (Abb. 3.24) und 4 (Abb. 3.25) sind 3' komplett, 5' allerdings nicht vollständig. Beim Hexamerin 2 (Abb. 3.23) handelt es sich um die ursprüngliche, mit Hilfe der RT-PCR aufgeklärte Sequenz, sie ist daher von beiden Enden unvollständig.

## Hexamerin 1

|            |                                                           |      |
|------------|-----------------------------------------------------------|------|
|            | CAGCCACCAACC                                              | 12   |
| ATG        | AAGTCTGCATTTCGACTCTTGGCCCTCGCGGCATTTCGCCGCTGCTTCTGTTCTTCT | 72   |
| M          | K S A F V L L A L A A F A A A S V L P                     | 20   |
| GGGGATACCA | CCGACCACAAGCGTGTGCTGACAAGGAATTCCTTGTCAAGCAGAAGAAC         | 132  |
| G          | D T T D H K R V A D K E F L V K Q K N                     | 40   |
| CTGCTGCA   | ACTGTTTGTGCGCCCCACCAATACAACCTGTACAAGGAGCAGGCCGAGATC       | 192  |
| L          | L Q L F V R P H Q Y N L Y K E Q A E I                     | 60   |
| GGTAAGGG   | TACTCTCTGGAGTCTCATCTTGCCGACTACACGAATGCGAAGGCTGTCAAA       | 252  |
| G          | K G Y S L E S H L A D Y T N A K A V K                     | 80   |
| CAGTTCTT   | CACGTCTACAAGCAGGGGATGTTGCCAAGGGCGAGATCTTCTGTCTTTC         | 312  |
| Q          | F L H V Y K Q G M L P K G E I F S V F                     | 100  |
| TACCAGG    | AGTACCTCGAGCAGGCCATCCACTTGTTGATGTCTTCTACTTCGCCAAGGAC      | 372  |
| Y          | Q E Y L E Q A I H L F D V F Y F A K D                     | 120  |
| TGGGACAC   | TTCTACAAGACTGCTTGCTGGGCTCGTGACCGTGAACGAGGGTCAGTTC         | 432  |
| W          | D T F Y K T A C W A R D R V N E G Q F                     | 140  |
| ATCTACG    | CCCTGTCCGTTGCTGCTCTCCAGCGTGAGGACTGCAAGGACTTCGTTCTGCC      | 492  |
| I          | Y A L S V A A L Q R E D C K D F V L P                     | 160  |
| CCAGTATA   | CGAAGTCTACCCCACTCTTCTCCAAAACGAGGTTCATCCAGAAGGCTTAC        | 552  |
| P          | V Y E V Y P H L F L Q N E V I Q K A Y                     | 180  |
| GAAGTC     | CAGGATGCAGGGTGAGCACTACACCGCTGTGGACACCGTTTACAAAGAAGGCGAG   | 612  |
| E          | V R M Q G E H Y T A V D T V Y K E G E                     | 200  |
| ACCTACTA   | CATCCCGCCAACTACTCTGGCTGGTATTACACTCAGTACCCCGAACAGTTC       | 672  |
| T          | Y Y I P A N Y S G W Y Y T Q Y P E Q F                     | 220  |
| ATCTCTTA   | CTTACTTACCGAGGATGTTGGCGTCAACGCATTCCACGCCTACTGGCACATGGAC   | 732  |
| I          | S Y F T E D V G V N A F H A Y W H M D                     | 240  |
| TATCCCTT   | CTGGGCCAACTCCAAGTACTACAACGTCAGTTCGACCGTCGTGGAGAGCTC       | 792  |
| Y          | P F W A N S K Y Y N V K F D R R G E L                     | 260  |
| TTCTACTA   | CACCCAGCTGATGGCCCGCTATTACCTGGAGCGTCTGTCTAACGGA            | 852  |
| F          | Y Y T Q H Q L M A R Y Y L E R L S N G                     | 280  |
| CTCAAGGA   | AATCAAGCCCTTCTCCTACTTTGAGACCCAGTCTCATATCCCTGGATACGAG      | 912  |
| L          | K E I K P F S Y F E T Q S H I P G Y E                     | 300  |
| CCATCTCT   | GCGCTACCCCAACGGCAAGGAATCCCATGCGCCCTGAGGGTGTCTCCATC        | 972  |
| P          | S L R Y P N G K E F P M R P E G V S I                     | 320  |
| CTGAACA    | ACTACCACGTTGAGGAAGTCTTCGCTCTTGAGAGGAGAATCCACGACGCCATC     | 1032 |
| L          | N N Y H V E E V F A L E R R I H D A I                     | 340  |
| GACCTTGG   | ATTTGTCTTCGGTAAGGACGGCCAGAAGATCTCCCTGAAGGAGAAGGAAGGC      | 1092 |
| D          | L G F V F G K D G Q K I S L K E K E G                     | 360  |
| ATCAGCAT   | TCTTGGAGACATGATTGAAGGTACCGAGGATTCTACCAACAAGCAGTTCTAT      | 1152 |
| I          | S I L G D M I E G T E D S T N K Q F Y                     | 380  |
| GGCTCCCT   | CTACAACATGCTCAGGACCGTGACGGCCACTATGCTGACCCCATGTACCAG       | 1212 |
| G          | S L Y N M L R T V Y G H Y A D P M Y Q                     | 400  |
| TATGAGGT   | TGCCCCAGCGTGCTCGAGCACTTCAACACGCCCTTAGGGACCCTGCCTAC        | 1272 |
| Y          | E V A P S V L E H F T T A L R D P A Y                     | 420  |
| TACACCCT   | GTACAAGCGCATCGACACCCTCTTCAAGGAATACAAGAAGCTCATGCCCGAG      | 1332 |
| Y          | T L Y K R I D T L F K E Y K K L M P E                     | 440  |
| TACACTTA   | TGATGAGCTCACCTACCCCGGTGTCAGGTTCGAGTCTGTTGAGATCGAAAAG      | 1392 |
| Y          | T Y D E L T Y P G V K Y E S V E I E K                     | 460  |
| CTCGTCA    | CTACTTCGACAACCTCGACATCGATCTCGACAACGCCGTCGATGTTGGAGTC      | 1452 |
| L          | V T Y F D N F D I D L D N A V D V G V                     | 480  |
| ATCGAGAT   | GGCCAGAAGGTCAACATCCAGGCCGCCAGATGCGTCTGAACCACAAGCCC        | 1512 |
| I          | E D G Q K V N I Q A R Q M R L N H K P                     | 500  |
| TACACCTA   | CAAGGTGAAGTTGTACAGCGACAAGGCCGCTACTTCCATGGTCCGTGTCTTC      | 1572 |
| Y          | T Y K V K V V S D K A A T S M V R V F                     | 520  |
| CTTGGACC   | CAAGTACGACTTCTACGGCAACGAGTACACTCTTGACAAGATGAGGGAGTAC      | 1632 |
| L          | G P K Y D F Y G N E Y T L D K M R E Y                     | 540  |
| ATGGTTGA   | GCTTGACCGCTTTACGTTCAAGATGACCTCTGGTGAGAACGTGATTGAGCGC      | 1692 |
| M          | V E L D R F T F K M T S G E N V I E R                     | 560  |
| AACTCCTA   | CAGATTCCAGTGTGACCGTGGCTGACAAGACCGCTTACAGGCAGCTCTTCAAG     | 1752 |
| N          | S Y D S S V T V A D K T A Y R Q L F K                     | 580  |
| AAGGTCGA   | CAAGGCCATCGCTGGAGAGGAACAGTTCTTCGTTGATGAGACTGAGCGTCAC      | 1812 |
| K          | V D K A I A G E E Q F F V D E T E R H                     | 600  |
| TGCGGATG   | GCCCCAGCGCTCCTTCTGCCCAAGGGCAAGAAGGGCGGTATGACTTTCGCT       | 1872 |
| C          | G W P Q R L L L P K G K K G G M T F R                     | 620  |

|                                                                      |      |
|----------------------------------------------------------------------|------|
| TTCTTCGTCATGGTCACTCCCTTCGACGAGACCTCCGTCACCGACATGAAGCACCTTGAC         | 1932 |
| F F V M V T P F D E T S V T D M K H L D                              | 640  |
| TTCACCTCCATGCCCTACTGCGGTGTTGGCAAGCACGGAGTCTACCCCGATAGCTACTCC         | 1992 |
| F T S M P Y C G V G K H G V Y P D S Y S                              | 660  |
| ATGGGCTATCCCTTCGACCGTACCATCGAGCACTACGACTTCTTCTACAATGCTCCAAAC         | 2052 |
| M G Y P F D R T I E H Y D F F Y N A P N                              | 680  |
| ATGCACTTCGATGATGTCATCATCTTCCACAAGACTGCTGAGGAACCTCAACATCAAGGTC        | 2112 |
| M H F D D V I I F H K T A E E L N I K V                              | 700  |
| CACCAC <u>TA</u> ACTGGTCATTCCGATGACAACGAGGGAAGCTTCTCTTTCATCTAGAAACAT | 2172 |
| H H                                                                  | 702  |
| TCCTTTGTTGGACAACCTCCAGTTAACATCGTGGGGGACGTTTATAGTAAGGCAGCTTATGAA      | 2232 |
| CACCTGTTGGTATCAATATCACTAACGTTGCTTCCATGAAGAGCTTTAACTGTTGTTAGA         | 2292 |
| GCGATGGTAGCAGAGAGCTGCAAGTAAGAAGAGAACTGTTCAAGTTTCCGAGATATTGAC         | 2352 |
| AACAATCTTGCTGTGAAAACGGTCAACTCTTTTCTCCCGAAATGGAGTGTTTTTGTGTTA         | 2412 |
| ACTTTTGTGTTGTCCCTTAGTTTTGC <u>ATAAA</u> CAAAAAAATCTAAAAAAAAAAAAAAA   | 2472 |
| AAA                                                                  | 2475 |

**Abb. 3.22:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) von *P. marginata* Hx1. Das Startcodon ist rot markiert. Stopcodon sowie das Polyadenylierungssignal sind grün gefärbt. Das putative Signalpeptid ist unterstrichen.

### Partielle Sequenz des Hexamerins 2

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| TTCTACCCCCACCTCTTCCTCCACAACGAGGTCATCCAGAAGGCCTACGAAGTCAGGATG60   |    |
| F Y P H L F L H N E V I Q K A Y E V R M                          | 20 |
| CAGGGTGAGCACTACACCGCTGTGGACTCCGTTTACAAGGTTGACAAGACTTATTACATT120  |    |
| Q G E H Y T A V D S V Y K V D K T Y Y I                          | 40 |
| CCTTCCAECTACTCTGGCTGGTATTACACTCGGCACCCCGAACAGTTCATCTCCTACTTC180  |    |
| P S N Y S G W Y Y T R H P E Q F I S Y F 60                       |    |
| ACTGAGGATGTTGGCATCAACGCATTCCACGCCTACTGGCACATGGACTATCCCTTCTGG240  |    |
| T E D V G I N A F H A Y W H M D Y P F W 80                       |    |
| GCCAACCTCAAGTACTACAACGTCAAGTTCGACCGTCGTGGAGAGCTCTTCTACTACACC300  |    |
| A N S K Y Y N V K F D R R G E L F Y Y T 100                      |    |
| CAGCACCAGCTGATGGCCCGCTACTACCTGGAGCGTCTGTCTAATGGTCTTGGAGAGGTC360  |    |
| Q H Q L M A R Y Y L E R L S N G L G E V 120                      |    |
| AAGCCCTTCTCTTACTTCGATAACGATGTTGTTGGATACCAGCCATCCCTCCGTTACCCC420  |    |
| K P F S Y F D N D V V G Y Q P S L R Y P 140                      |    |
| AGCGGCAAGGAGTTCCCCATGCGTCCCGATGGTTTCTTGGTCAACGACCTGAAGGCTGAT480  |    |
| S G K E F P M R P D G F L V N D L K A D 160                      |    |
| GACATCTACGCCCTTGAGAGGAGGATCTATGATGCTATCGATCTTGGATTTATCTACGGC540  |    |
| D I Y A L E R R I Y D A I D L G F I Y G 180                      |    |
| AAGGAAGGCCAGAAGATCTCCCTGAAGGAGAAGGAAGGCATCAGCATCCTTGGAGATATG600  |    |
| K E G Q K I S L K E K E G I S I L G D M 200                      |    |
| ATTGAAGGCACTGGTGACTCTGTCAACAAGAACTACTATGGTTCCATCTACAACACGATC660  |    |
| I E G T T G D S V N K N Y Y G S I Y N T I 220                    |    |
| AGGACCGTTTTTCGGCCACCATGCTGACCCCATGTACCAATACCTGGTTGCTCCCGGCGTG720 |    |
| R T V F G H H A D P M Y Q Y L V A P G V 240                      |    |

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| CTCGAGCACTTCCAGACCGCCCTTAGGGACCCCGCCTACTACACCCTGTACAAGCGCATC780 |      |
| L E H F Q T A L R D P A Y Y T L Y K R I 260                     |      |
| GACACCCTCTTCAAGAGCTACAAGAAGCTCATGCCGAGTACACCTACGATGAAGTCACC840  |      |
| D T L F K S Y K K L M P E Y T Y D E V T 280                     |      |
| TACCCCGGCTACAAGATCGAATCTTTTGAGACCGACAAGCTCGTCACCTACTTCGACAAC900 |      |
| Y P G Y K I E S F E T D K L V T Y F D N 300                     |      |
| TTCGATATCGATCTCGACAACGCTGTGATGTTGGAGTCATCGAGGATGGAGAGCACGTC960  |      |
| F D I D L D N A V D V G V I E D G E H V 320                     |      |
| AACATCCAGGCCCGCCAGATGCGCCTAAACCACAAACCATTC                      | 1002 |
| N I Q A R Q M R L N H K P F                                     | 334  |

**Abb. 3.23:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) von *P. marginata* Hx2.

Am 5'-Ende fehlen etwa 500 Basenpaare, am 3'-Ende etwa 800 Basenpaare. Daher fehlen neben dem Startcodon und dem Signalpeptid auch Stopcodon und das Polyadenylierungssignal.

### Partielle Sequenz des Hexamerins 3

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| GCCCTCTCTGTGGCCATGAGCCAGCGAGAGGACTGCAGGAACCTTCTCCTCCCGCCCATC  | 60   |
| A L S V A M S Q R E D C R N F F L P P I                       | 20   |
| TACGAGGTCTATCCCAGCCGCTTCATCAAGGGAGAGACCATCCAGAAGGCCTACGACATC  | 120  |
| Y E V Y P S R F I K G E T I Q K A Y D I                       | 40   |
| CAGATGCAAGGTGAACACTACAAACCAACCACCGATGACATCTTCAAGGTCGACAAGACC  | 180  |
| Q M Q G E H Y K P T T D D I F K V D K T                       | 60   |
| TACTACATCCCCTCGAACTACACTGGCTGGTGGTTACGAAGACCCCGAGCAGTTCCTG    | 240  |
| Y Y I P S N Y T G W W F T K T P E Q F L                       | 80   |
| TCCTACTTCACCGAGGATGTCGGTGTGAACCTCTTCAACACCTACTGGAACCTACTTCTAT | 300  |
| S Y F T E D V G V N S F N T Y W N Y F Y                       | 100  |
| CCCTCCTGGTACAACGCCTCCTACTACAACCTTCAAATTCGATCGCCGTGGTGAGCTCTTC | 360  |
| P S W Y N A S Y Y N F K F D R R G E L F                       | 120  |
| TATTACAGCAAGCAGCAGCTGCTGGCTCGCTATCAGCTGGAGAGACTCTCAAACGACCTT  | 420  |
| Y Y S K Q Q L L A R Y Q L E R L S N D L                       | 140  |
| CCCGAGATCAAGCCGTACAACCTACTTCTCCTTCAAGGCTCTGCCAGTTATGAGTCCTGC  | 480  |
| P E I K P Y N Y F S F K A L P S Y E S C                       | 160  |
| CTCAGCTACGAGAATGGCAAGGCGTTCCCCAACCGTCTGAGGGAACCTATCCCAAATTC   | 540  |
| L S Y E N G K A F P N R P E G T Y P K F                       | 180  |
| TTCAAGAAGGAAGAGATGCAGGACTTCGAGAAGAGGATCAAGTTCCGCATTGACTTCGGA  | 600  |
| F K K E E M Q D F E K R I K F A I D F G                       | 200  |
| TACGTTTTCAATAACGACAAGAAGAAGGTGTCTATCTATGAGAAGGACGGCATCTCCATT  | 660  |
| Y V F N N D K K K V S I Y E K D G I S I                       | 220  |
| CTAGGAGAGATCATCGCATCCTGTGAGAACTCCAACCTACAAGAACATGTACGGTACCCTC | 720  |
| L G E I I A S C E N S N Y K N M Y G T L                       | 240  |
| TACTACTCCATCCTGAAAACGTTTCGGCCACGAAGTTGACCCACAGTATCAGTACAAATTC | 780  |
| Y Y S I L K T F G H E V D P Q Y Q Y K F                       | 260  |
| GCTCCCCCTGCCCTGGAACAAATCCACACCACCTTAGAGACCCTGCCTACTACGTCCTC   | 840  |
| A P P A L E Q I H T T L R D P A Y Y V L                       | 280  |
| TACAAGCGCATCGACGACTCTTCAAGAAGTACAAGGCCAACCTCCCAAGTACACCATC    | 900  |
| Y K R I D D L F K K Y K A N L P K Y T I                       | 300  |
| GACGAAGTACCTTCCCCGAGTCAAGGTGACTCTGTCAAGGTGACAAACTGGTCACC      | 960  |
| D E L T F P G V K V D S V K V D K L V T                       | 320  |
| TTCTTCGACAACCTTCGACGTCGCCCTGGACAACGTCGTCAGCGTCGGCAAGAGTGAAGAG | 1020 |
| F F D N F D V A L D N V V S V G K S E E                       | 340  |
| GGTGAGAAGGTGGACATCCGTGCCCGTCAGTTCGCCCTCAACCACAAGCCATTACCTAC   | 1080 |
| G E K V D I R A R Q F R L N H K P F T Y                       | 360  |
| AAGGTCAAGGTCAACGAGGAGAAGGACACCAATGCCATGGTACGCGTCTTCTCGGACCC   | 1140 |
| K V K V T S E K D T N A M V R V F L G P                       | 380  |

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| AAGTACGACTATCTGGGCAACGCGTTTCAGCCTCGAAAAGATGAGTGACTACATGATCGAG | 1200 |
| K Y D Y L G N A F S L E K M S D Y M I E                       | 400  |
| TTGGACAGATTACCCACAAGCTGAGCTCCGGTGCCAACACCATCGAGCGGAAGTCGGAA   | 1260 |
| L D R F T H K L S S G A N T I E R K S E                       | 420  |
| GACTCTGCCGTGGCCTTCACTGAGAAACCCTCCTACAGGGAGCTCTTCGCCAAGATCAAC  | 1320 |
| D S A V A F T E K P S Y R E L F A K I N                       | 440  |
| AAGGCTATCTCCGGAGAGGAGCCCTTCTACTACGACGAGACTGAGCGCCAATGTGGATGG  | 1380 |
| K A I S G E E P F Y Y D E T E R Q C G W                       | 460  |
| CCACAGCGCCTTCTGTTGCCAAGGGTAAACCTGAGGGCATGAAGTTCAGCTTCTTCGTG   | 1440 |
| P Q R L L L P K G K P E G M K F S F F V                       | 480  |
| ATGGTCAGTCCCTTCGAGGAGAAGTTCGTCAAGGAGAAGAAGCTCCTGAGCTACAGGTCC  | 1500 |
| M V S P F E E K F V K E K K L L S Y R S                       | 500  |
| TTCCCGTACGCCGGCGTTGCCAAGGATGGTCAGTATCCCGACGACAAGGCCATGGGCTAT  | 1560 |
| F P Y A G V A K D G Q Y P D D K A M G Y                       | 520  |
| CCCTTCGACCGCGTCATCGACGACCAAGACTACTTCTACAAGGCCCCCAACATGTTCTTC  | 1620 |
| P F D R V I D D Q D Y F Y K A P N M F F                       | 540  |
| GAGGACGTCTCCATCTACTTCAAGGGGGAGGGAGAGAGCAACACTGCTCGACAACAT     | 1680 |
| E D V S I Y F K G E G E S N T A R Q H                         | 559  |
| CTCGGAACCCCTATAACGACCCGCACTCTGACGAGGACCTCTTTACACATCGACAACCT   | 1740 |
| TCATTTCTCTTTGAAAGCGATGGATCACAAACGCTACGGTTATAAGTAGCAAAAGAATTT  | 1800 |
| GTTCGGAATTTACGTGTTTGTGTTTCTAAAATG                             | 1860 |
| AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                         | 1881 |

**Abb. 3.24:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) von *P. marginata* Hx3. Am 5'-Ende fehlen etwa 400 Basenpaare. Daher fehlen das Startcodon und das Signalpeptid. Stopcodon und das Polyadenylierungssignal sind grün gefärbt.

#### Partielle Sequenz des Hexamerins 4

|                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------|-----|
| TACCTCGAGCAGGCCATCCACCTCTTCGACATCTTCTTCTTCGCCAAGGACTTCGAGACC | 60  |
| Y L E Q A I H L F D I F F F A K D F E T                      | 20  |
| TTCTACAAGACCGCATGCTGGGCTCGTGATCATGTCAACGAGGTATGTTTCGTGTATGCT | 120 |
| F Y K T A C W A R D H V N E G M F V Y A                      | 40  |
| TTTTCCGTGGCTGTCTCCACCGTGAAGACTGCAAGTACTTCGTCTCTCCCCCTCCCTAT  | 180 |
| F S V A V L H R E D C K Y F V L P P P Y                      | 60  |
| GAGGTGTACCCCACTCTTCGTCAACAACGAGGTATCCAGAAGGCTTACGAAGTCAAG    | 240 |
| E V Y P H L F V N N E V I Q K A Y E V K                      | 80  |
| ATGCAGGGCGAGCACTACACCCACGTCGACTCCGTCTTCAAGCAGGAGAACACCTACTAC | 300 |
| M Q G E H Y T H V D S V F K Q E N T Y Y                      | 100 |
| ATCCCCACCAACTACTCTGGATATTATTACACCAAGCACCCCGAGCAGTTCCTTACCTAC | 360 |
| I P T N Y S G Y Y Y T K H P E Q F L T Y                      | 120 |
| TTCACTGAGGATGTGGCGTCAACTCCTTCAACGCCTACTGGCACCTGGACTACCCCTTC  | 420 |
| F T E D V G V N S F N A Y W H L D Y P F                      | 140 |
| TGGATGAATTCTCAGCACTACAACCTCAAGTTCGACCGTCGTGGAGAGCTCTTCTACTAC | 480 |
| W M N S Q H Y N L K F D R R G E L F Y Y                      | 160 |
| ACCCAGCACAGCTGATGGCCGCTACTACCTGGAGCGTCTGTCTAACGGACTCGGAGAC   | 540 |
| T Q H Q L M A R Y Y L E R L S N G L G D                      | 180 |
| CTCAAGCACTTCGACTGGTTTGACAAGAAGACCCAGATGGTCGGTTATGAGCCATCTCTG | 600 |
| L K H F D W F D K K T Q M V G Y E P S L                      | 200 |
| CGCTACCAGAACGGACAGGAGTTCAACCAGCGTCTGAGGGAGCTAACTTCTACAGGAAC  | 660 |
| R Y Q N G Q E F N Q R P E G A N F Y R N                      | 220 |
| TACAGGAGCGAGGATGCTATGATCTTCGAGAGGAGGATTCTTGACGCTATTGATATGGGA | 720 |
| Y R S E D A M I F E R R I L D A I D M G                      | 240 |
| TACATTGTACCAAGGAGGGCCGGAAGCTTCCCTGAAGGAAAAGGAAGGCATCACCTTC   | 780 |
| Y I V T K E G R K L S L K E K E G I T F                      | 260 |

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| CTCGGTGAGCTCATCATGGCCACCGGCGACTCTCCCAACAAGGACTTCTATGGTCAGATG  | 840  |
| L G E L I M A T G D S P N K D F Y G Q M                       | 280  |
| TACTCCATCCTCTGCACCGTCTTCGGACACGTCATGGACCCACCTTCAAGTATGATACC   | 900  |
| Y S I L C T V F G H V M D P T F K Y D T                       | 300  |
| GTTCCAGCGTGTTGGAGCACTACGAGACTGCCCTCAGGGACCCCATGTACTACACCTG    | 960  |
| V P S V L E H Y E T A L R D P M Y Y T L                       | 320  |
| TATATGCGCATGGAGAAGCTGTTCCACCGCTACAAGTCCCTCCTGCCACCTACACCAAG   | 1020 |
| Y M R M E K L F H R Y K S L L P T Y T K                       | 340  |
| GAGGAGCTCTTCTGGAACGGAATCAAGGTTGAGAACGTTGAGGTTGACAAGCTGATCACC  | 1080 |
| E E L F W N G I K V E N V E V D K L I T                       | 360  |
| TACTTCGACAAGTTCGACTTCGACCTCGACAACGCTGTCGATGTTGGAATCATCGAGGAT  | 1140 |
| Y F D K F D F D L D N A V D V G I I E D                       | 380  |
| GCTCAGTACGTCAACATCCAGGCCCGCCAGATGCGTCTGAACCACAAGCCCTACACCTAC  | 1200 |
| A Q Y V N I Q A R Q M R L N H K P Y T Y                       | 400  |
| AAGATGAAGTTGTACGCGACAAGGCCGCTACCGCCATGGTCCGAGTCTTCCTTGGACCC   | 1260 |
| K M K V V S D K A A T A M V R V F L G P                       | 420  |
| AAGTACGACTTCTACGGCAACGAGATGACCCTGGAGATGATGAGAGATTACATGGTCGAG  | 1320 |
| K Y D F Y G N E M T L E M M R D Y M V E                       | 440  |
| ATGGACCGATTCTGCTACAAGCTGAAGGTCGGTACCAATGAGATCGAGCGTAACTCCATC  | 1380 |
| M D R F V Y K L K V G T N E I E R N S I                       | 460  |
| GACTCCAGTGTGACCATCAAGGACAAGATGAGCTACAGGCAGCTGATGTTACAGCAGCC   | 1440 |
| D S S V T I K D K M S Y R Q L M F T A A                       | 480  |
| AAGGCCTATACTGGCGAGACTACCTGGGAAATCGATGAGACCAACCGCCACTGCGGATGG  | 1500 |
| K A Y T G E T T W E I D E T N R H C G W                       | 500  |
| CCCCAGCGCCTTCTCCTGCCCAAGGGCAAGAAGTCCGGCATGCCCTTCCGTTACTTCGTG  | 1560 |
| P Q R L L L P K G K K S G M P F R Y F V                       | 520  |
| ATGGTGACTCCCTTCGAGGAGAAGACCTCTGGCAGCGACTTCTCCTTCTGGGACATGAAG  | 1620 |
| M V T P F E E K T S G S D F S F W D M K                       | 540  |
| TCCATCTCCTACTGCGGTGTCAAGCACTACGGCCAGTACCCCGACTCCTTCCCATGGGA   | 1680 |
| S I S Y C G V K H Y G Q Y P D S F P M G                       | 560  |
| TATCCCTTCGACCGCGTCATCGACAACACTACGAGTACTTCTTCTCCGCCCAACATGTAC  | 1740 |
| Y P F D R V I D N Y E Y F F S A P N M Y                       | 580  |
| TGGAAGGATGTCGTCATCTTCCACAAGAAGACCGATGACTACTCTCCCATTTTCATTAAGA | 1800 |
| W K D V V I F H K K T D D Y S P I S L R                       | 600  |
| TGATGAGCATGAAGAAGTGAGCCTCTAGTTGCTGCTGATGCTAACT                | 1846 |

**Abb. 3.25:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) von *P. marginata* Hx4.

Am 5'-Ende fehlen etwa 400 Basenpaare. Daher fehlen Startcodon und das Signalpeptid. Das Stopcodon ist grün markiert. Das Polyadenylierungssignal fehlt, da sich bei der Sequenzierung am Poly-A-Schwanz ein „Slippage“ ereignete und die Sequenz daher nicht vollständig ist.

### 3.5.2 Das Hexamerin von *Thermobia domestica*

Das Hexamerin von *T. domestica* wurde im Rahmen einer Durchmusterung der cDNA-Bank während des Antikörperscreenings auf Hämocyanin gefunden (Abb. 3.26). Weitere Hexamerin-Untereinheiten konnten nicht identifiziert werden. Wie schon bei der Steinfliege besitzt der Ofenfisch sowohl Hämocyanine als auch Hexamerine in der Hämolymphe. Die cDNA ist bei einem offenen Leserahmen von 711 Aminosäuren 2470 Basenpaare lang. Dieser kodierende Bereich resultiert bei der Translation in ein Protein mit 82,4 kDa Molekülmasse ( $pI = 6,75$ ). Wie auch das der Steinfliege besitzt das Hexamerin von *T. domestica* ein Signalpeptid, das hier aber zwei Aminosäuren länger ist.

#### Hexamerin 1

|                                                               |                                                          |      |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------|
|                                                               | CACAACTCTACAACG                                          | 15   |
| ATG                                                           | GCTCAGACTCTAGTACTGATATCCACTCTTCTGTTGCCTTTGTGGCAGCAACGAAT | 75   |
| M                                                             | A Q T L V L I S T L L V A F V A A T N                    | 20   |
| ATCCATCATTATAATAGAAGATATGACGACAGAGTTGCTGCGGACAATTATCATTTAAAC  |                                                          | 135  |
| I                                                             | H H Y N R R Y D D R V A A D N Y H L N                    | 40   |
| AAGCAGGATGTAATCATTAACTGCTGCACAGAGTTCACCAGCCCAATCAGTACAGAGAT   |                                                          | 195  |
| K                                                             | Q D V I I K L L H R V H Q P N Q Y R D                    | 60   |
| CTGGCAGATATTGGAACAACATAACATCGAACAGAATGTAGACAAATACCAGAATGAA    |                                                          | 255  |
| L                                                             | A D I G N N Y N I E Q N V D K Y Q N E                    | 80   |
| GAACTGTGAGAAAGTTTGTGGAGCAATACAAAAAGGAATGCTTCCAAGAGGTCGTATC    |                                                          | 315  |
| E                                                             | A V R K F V E Q Y K K G M L P R G R I                    | 100  |
| TTCTCTATTTTTGACAAGAAACAACAAGATGAAATGATCAATCTTTTCGAAGTCTTCTAT  |                                                          | 375  |
| F                                                             | S I F D K K Q Q D E M I N L F E V F Y                    | 120  |
| TATGCTAAGGATTTTGATACTTTCTTAAAACTGCTTGTGTTTGCCAGGGACAGAGTTAAT  |                                                          | 435  |
| Y                                                             | A K D F D T F L K T A C F A R D R V N                    | 140  |
| GAAGGTCAATTCGTTTCATGCTTTCTTAACTGCAATCTGCATCGTGAGGACACTAAGGAC  |                                                          | 495  |
| E                                                             | G Q F V H A F L T A I L H R E D T K D                    | 160  |
| GTGTTCTCTCCACCTATCTACGAAGTCATGCCTCACTTCTTCTTGACACCAAAGTCATC   |                                                          | 555  |
| V                                                             | V L P P I Y E V M P H F F L D T K V I                    | 180  |
| AAGAAAGCTTATGAAGCCAAAATGAGGCAAGAGAATGCTTTGATTAAGATGAACTACACT  |                                                          | 615  |
| K                                                             | K A Y E A K M R Q E N A L I K M N Y T                    | 200  |
| CATAACAGACAATTGAAGAATGAAGACCAGAAGGTGGCGTACTTCAGTGAAGATATGGGA  |                                                          | 675  |
| H                                                             | N R Q L K N E D Q K V A Y F S E D M G                    | 220  |
| TAAATCAATTCTATTCTTACTATCAGATGGACCATCCTTTCTTTTACAAGAAGGACTAT   |                                                          | 735  |
| L                                                             | N Q F Y S Y Y Q M D H P F F Y K K D Y                    | 240  |
| GGCACCGAGGAAGACCGTAAGGGAGAGCTCTTCTACTACATGCACCAACAGCTCTTGGCA  |                                                          | 795  |
| G                                                             | T E E D R K G E L F Y Y M H Q Q L L A                    | 260  |
| AGGTACGACCTTGAGAGGCTAGCCAATGATCTACCAACCATCGAAACGCTCAAACCTCAAC |                                                          | 855  |
| R                                                             | Y D L E R L A N D L P T I E T L K L N                    | 280  |
| AAATATGTAAAGCGTGGGTATGCTCCTAAGTTGCTTACAGACAAGGAGAAGATTTTCCA   |                                                          | 915  |
| K                                                             | Y V K R G Y A P K L S Y R Q G E D F P                    | 300  |
| TTGCGCCCTGATAACCTCCAACCTGAAAGACTTGGACTACGAGAAACCAGAAGAACGGCTG |                                                          | 975  |
| L                                                             | R P D N L Q L K D L D Y E K P E E R L                    | 320  |
| AAAGTACGAGATGTTAATGATTACGAAAGGAGAGTACGTGACGCAATTGATAGAGGATAC  |                                                          | 1035 |
| K                                                             | V R D V N D Y E R R V R D A I D R G Y                    | 340  |
| ATCTTTACGGATGAAAACAACCAAGTTCTCTCAACAACGATAAGGGGATTGATATTTTA   |                                                          | 1095 |
| I                                                             | F T D E N N Q V P L N N D K G I D I L                    | 360  |
| GGAAAAATTGTCGGAGCCACTCATGATGAGAATGACAAATATTATGGCAACAAATACCAT  |                                                          | 1155 |
| G                                                             | K I V G A T H D E N D K Y Y G N K Y H                    | 380  |
| GGTTCCATTAAGACAATGACACACAAGATTGTGGGACGTGTCACTGATCCTGAAGATAAG  |                                                          | 1215 |
| G                                                             | S I K T M T H K I V G R V T D P E D K                    | 400  |

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| TACGATCAAACCTCCAGCGTTCTGGAACATTATGAGACTTCTGTCCGTGATCCTGCATTC  | 1275 |
| Y D Q T P S V L E H Y E T S V R D P A F                       | 420  |
| TACAGCATCCACAAGAGAATCAACAGACTTTTCCAGAAACATAAGGAAAATCTACCACAA  | 1335 |
| Y S I H K R I N R L F Q K H K E N L P Q                       | 440  |
| TACACTCGCCAAGACATCCAGGAACAAGGAGTAAAGTGGTGAATGTAGAAGTTGATAAA   | 1395 |
| Y T R Q D I Q E Q G V K V V N V E V D K                       | 460  |
| CTGATGACATACTTTGAGGATTATGATGTGGACCTCACCAACGTTGTAGATGCCACCTTG  | 1455 |
| L M T Y F E D Y D V D L T N V V D A T L                       | 480  |
| AAGGAGGGAGAACGCCAACCAATTCCAACAAGATCAGGAAGTGATCATCAAGGCACGCGTA | 1515 |
| K E G E R Q Q F Q Q D Q E V I I K A R V                       | 500  |
| AAGAGGATCAACCACAAACCTTTCACTGTAAAGTTGAGGTTGAAAGTGACAACAATAAG   | 1575 |
| K R I N H K P F T V K V E V E S D N N K                       | 520  |
| AATGCCATGGTACGTGTCTTCTTGGACCCAAATACAACCTACCTGGGACAAGAATTGTCC  | 1635 |
| N A M V R V F L G P K Y N Y L G Q E L S                       | 540  |
| TTGGAGGAAAAGAGGCAATACATGGTGGAACTGGACAGATTCCCTGTACAATTGACTTCT  | 1695 |
| L E E K R Q Y M V E L D R F P V Q L T S                       | 560  |
| GGGAAGAACGTAATCCAGAGAGAATCTAAGGACTTCAACTCTATTGTTCTGATCATATC   | 1755 |
| G K N V I Q R E S K D F N S I V P D H I                       | 580  |
| CCCACCAAAAACCTGAAACACATGGTGAAGAGTGCTGTTGAAGGAGAACAGACCTTTTAC  | 1815 |
| P T K N L K H M V K S A V E G E Q T F Y                       | 600  |
| GTTCAGAAGGGAAAACGCCAGTGTGGTCTTCTGAGCATCTTCTTTTGCCTAAGGGTAAG   | 1875 |
| V Q K G K R Q C G L P E H L L L P K G K                       | 620  |
| AAGGCAGGACTTCCATTACCCCTCTTTATCATGGTTACAGAGAATGAGAATATGAACAA   | 1935 |
| K A G L P F T L F I M V T E N E N N E Q                       | 640  |
| GATAATGTCAACTACAAACAGCCCTTCATCCTTTGCGGTGTAAAGGAAGGCAAGTACCCT  | 1995 |
| D N V N Y K Q P F I L C G V K E G K Y P                       | 660  |
| GATACCAAGCCCATGGGATATCCTTTGACAGGAAATTCGATGAACGCGACATCAAGAGT   | 2055 |
| D T K P M G Y P F D R K F D E R D I K S                       | 680  |
| GCGACCAATGTCTACGTTAAGGACGTCCTCATCTACCACAAAAGGGATGTTAGCGAATCA  | 2115 |
| A T N V Y V K D V L I Y H K R D V S E S                       | 700  |
| AGCGACAAGTACAGTCAGTATGATGACTTGATTAAGTCAAAACAATTGACCAACTCTAAG  | 2175 |
| S D K Y S Q Y D D L Y                                         | 711  |
| TACAAATTCTATTTACATGGCTATTTCGCTAACAAAGCAACTAAGTATAAATAATTGTCAT | 2235 |
| TCAGGTATCTCCATTTGCTCGTAAGAACTCAAACTGACATGCCTATTATCCATGGATTGC  | 2295 |
| ACATTTGCAAGAGCGATAAAATGTCAAAATTTATCTTAGTGGCTTTGTGGGCCGAATATC  | 2355 |
| AACACTAACTGCTGTGATCACATTGTTCTGTTACCTTTTGTGTAAGATGTGAAACGAAA   | 2415 |
| AATAAAATCTATTTTCATATTAAAAAATAAAAAAAAAAACTCGA                  | 2470 |

**Abb. 3.26:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) von *T. domestica* Hx1. Das Startcodon ist rot markiert, das putative Signalpeptid unterstrichen. Stopcodon sowie das Polyadenylierungssignal sind grün gefärbt.

### 3.6 Charakterisierung der Phenoloxidase des Onychophoren *Epiperatus spec.*

Seit wenigen Jahren ist bekannt, dass der Onychophore *Epiperatus spec.* über Hämocyanin verfügt (Kusche et al., 2002). Fraglich war bislang, ob bereits in diesem basalen Arthropodentaxon auch eine Phenoloxidase vorhanden ist. Im Rahmen eines Onychophora-EST-Projektes wurde eine Massen *in vivo* Excision auf einer bereits in Mainz vorhandenen cDNA-Bank von *Epiperatus spec.* durchgeführt. Das Picken der Klone, sowie die Sequenzierung erfolgten dann im Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin. Im Rahmen der dortigen Untersuchungen gelang es, ein 3'komplettes Teilstück einer Prophenoloxidase von *Epiperatus spec.* zu finden (Abb. 3.27). Aufgrund dieser Sequenz konnten nun spezifische reverse Primer generiert werden. Die Bank wurde im Rahmen einer PCR mit diesen Primern sowie dem pBK-CMV internen T7-Primer auf das fehlende 5'-Ende durchsucht. Trotz intensiver Suche konnte hierbei nur ein weiteres Teilstück gefunden werden. Es ist davon auszugehen, dass sich in der vorhandenen Bank keine 5'kompletten Klone befinden. Es war im Untersuchungszeitraum auch nicht möglich, Exemplare von *Epiperatus spec.* zu erhalten, da es sich um ein Versuchstier handelt, dessen Beschaffung sich in der Praxis als schwierig gestaltet.

#### Partielle Sequenz der Prophenoloxydase

```

TCTGGTTTACAATCTAGTGGCCGTCCTAAGGATTTAACACTTCAGAGTATAATAGATAAC      60
S G L Q S S G R P K D L T L Q S I I D N                                20
CCCTTAGCAGGTACTGTAAGACTTTTCTGATGTTGTACATGGTATAACAATCTTGTAACA      120
P L A G T V R L S D V V T W Y N N L V T                                40
GCTATTTCAAATGGAAGTGGTTAGGAGCAATGGACAATCAATTAATATTAACACATTA      180
A I S N G R M V R S N G Q S I N I N T L                                60
GCAGGAATAGATGCTTTAGGAGCTGCTATAGAAGCCAGCTCTTCTAGCCCCAACAGAAAT      240
A G I D A L G A A I E A S S S S P N R N                                80
ATATATGGCAACTTGCATAATTCAGGACATGTTCTTTGAGCTTTTATTCACGATCCCACA      300
I Y G N L H N S G H V L L S F I H D P T                                100
GGACAATATAATGCACCACAAGGAGTTATGGCAGGTACAGAAACAGCCTGCAGAGATCCT      360
G Q Y N A P Q G V M A G T E T A C R D P                                120
TTGTTTTGGCGTTGGCAAACTTGTGGATAATGTTTTTGCTTTTCATAAATCAAGACTG      420
L F W R W H K L V D N V F A F H K S R L                                140
CCAGCATATACTGAAGAAGAAGTTGGGTGGACAGATGTGGAAATAGAAAGTGCTAATGTT      480
P A Y T E E E V G W T D V E I E S A N V                                160
CAATCAACTTCACAGACTTTTACTGCTGCAAATCAAATGCATACTTATTTTAAGACTAGA      540
Q S T S Q T F T A A N Q M H T Y F K T R                                180
AAGTTAGATCTGTCAAGAGGGCTTGACTTTGAAGTGCAGAGATTCAATACCAAGTGAAC      600
K L D L S R G L D F E A A G D S I P V N                                200
ATTACACATCTAGATCCCCTTCCATTTACCTATACCATCACTGCAACTTCCTGGAGTGAA      660
I T H L D P L P F T Y T I T A T S W S E                                220
CAAAGTACTCAAGGACATGTGAGAATATTTCTTTCCCAAATTTGCACCTGGTGGCACT      720
Q S T Q G H V R I F L S P K F A P G G T                                240

```

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| CCACATGATGATGATGACTTACGTCACAATGCTTTTGAAATGGATCGATTTACTGTTAAC  | 780  |
| P H D D D D L R H N A F E M D R F T V N                       | 260  |
| TTAAATCCTGGAACAAATACTATAATCAGAAGTTCCAGGGAATCTGCAGTTACTATGGTT  | 840  |
| L N P G T N T I I R S S R E S A V T M V                       | 280  |
| CCTAACCGACAGTGGGAACAATTATCAAATGTTGATGTTGAGTTTAGTCCTTCAGATGAT  | 900  |
| P N R Q W E Q L S N V D V E F S P S D D                       | 300  |
| AATGATAATTTCTGTGGGTGTGGCTGGCCAGATCACTTATTGGTACCTAGAGGAACCCCA  | 960  |
| N D N F C G C G W P D H L L V P R G T P                       | 320  |
| ACAGGAATGAGATTTGTACTTATTGTAGCAATTTCCGACTGGAGCAAGGAAGCTATTGGT  | 1020 |
| T G M R F V L I V A I S D W S K E A I G                       | 340  |
| ACAGACAATACTATGCGAGTATGTGATGATTCTTACTATGTGTGGATTATTAGGAAGA    | 1080 |
| T D N T M R V C D D S L T M C G L L G R                       | 360  |
| AGGTTTCCTGATCAAAGAGCTATGGGTTATCCTCTTGATCGACCTATACCTCCAGATTCT  | 1140 |
| R F P D Q R A M G Y P L D R P I P P D S                       | 380  |
| TCATGGTTTAAAAGATCTAATATGATTCTTAGAGATATAACCATCTTTCACAGAACAAAGA | 1200 |
| S W F K R S N M I L R D I T I F H R T R                       | 400  |
| CAAACCTTGCTCTGAATGTGTGTAAATTATTTTAAATAATATTTTCTAAACG          | 1255 |
| Q T C S E C V                                                 | 407  |

**Abb. 3.27:** Nukleotid- (oben) und Aminosäuresequenz (unten) von *Epiperatus spec.* PPO. Am 5'-Ende fehlen etwa 900 Basenpaare. Daher fehlt das Startcodon. Stopcodon und Polyadenylierungssignal wurden grün gefärbt. Die drei Histidine, welche mit den Kupferionen der Sauerstoffbindungsstelle CuB koordiniert sind, wurden blau markiert. Die Histidine der Sauerstoffbindungsstelle CuA fehlen.

## 4. Diskussion

Sauerstoff ist für die meisten mehrzelligen Tiere (Metazoa) zum Überleben notwendig. Mit der Ausbildung von echten Geweben und differenzierten Organen erhöht sich der Bedarf zusätzlich. Eine Möglichkeit, um die Effektivität der Sauerstoffaufnahme und des Sauerstofftransportes zu steigern sind respiratorische Proteine, zu denen auch das Hämocyanin gehört. Zu Beginn der Arbeit waren in fast allen Arthropodenunterstämmen, außer bei den Insekten Hämocyanine nachgewiesen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Hämocyanine in weiteren Arthropodentaxa zu identifizieren. Darüber hinaus sollten dort, wo die Hämocyanine strukturell und/oder immunologisch bereits untersucht worden waren, die Sequenzen verschiedener Hämocyaninuntereinheiten erarbeitet werden. Diese Sequenzen sollten dann in phylogenetischen Untersuchungen dazu benutzt werden, die Evolution der Hämocyanin-Superfamilie nachzuvollziehen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Arbeit war die vergleichende Untersuchung der Evolution von Hämocyaninuntereinheiten innerhalb der einzelnen Arthropodengruppen. Geklärt werden sollte hierbei in erster Linie, ob die Diversifikation der Untereinheiten vor oder nach Trennung einer Spezies von einer anderen stattgefunden hat. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit im Hinblick auf die Evolution der Mitglieder der Hämocyanin-Superfamilie diskutiert und es wird versucht, daraus neue Erkenntnisse über die Evolution der Arthropoden abzuleiten.

### 4.1 Hämocyanine der Myriapoden

Da Myriapoden in der Regel über ein gut ausgebildetes Tracheensystem verfügen, ging man davon aus, dass diese Arthropodengruppe nicht auf respiratorische Proteine angewiesen ist. Als ein 36-meres Hämocyanin bei dem Chilopoden *S. coleoptrata* entdeckt wurde (Mangum et al., 1985), erklärte man dies damit, dass es sich bei dem blind endenden Tracheensystem des Spinnenläufers um eine Sonderform handelt und er als Räuber schnell über viel Sauerstoff verfügen muss. Mittlerweile sind 6x6-mere Hämocyanine aber auch bei Vertretern der Diplopoden (innerhalb der *Spirostreptidae*) gefunden worden (Jae-nicke et al., 1999) und es liegt eine cDNA- Sequenz von *Spirostreptus spec.* vor (Kusche und Burmester, 2001). Daher kann man davon ausgehen, dass die Hämocyanine, die in

den bisher untersuchten Spezies vorkommen keine Ausnahme darstellen, sondern vielmehr innerhalb der Myriapoden weit verbreitet sind.

#### 4.1.1 Die Hämocyanine von *Archispirostreptus gigas* und *Scutigera coleoptrata*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls verschiedene Vertreter der Chilopoden und Diplopoden untersucht. Hierbei konnte bei dem zu den Spirostreptidae gehörenden Diplopoden *A. gigas*, der nahe mit dem bereits untersuchten *Spirostreptus spec.* verwandt ist, ebenfalls ein 36-meres Hämocyanin gefunden werden. Die identifizierte Hämocyaninuntereinheit (Hc1) weist eine Identität von über 94% mit der Untereinheit 1 des Hämocyanins von *Spirostreptus* auf (Tabelle 1). Interessanterweise konnten bei *A. gigas*, wie zuvor schon bei *Spirostreptus spec.* im Western-Blot zwei Hämocyaninbanden in unterschiedlicher Höhe gefunden werden. Es war aber nicht möglich, zwei unterschiedliche cDNA-Sequenzen zu erhalten. Bei *Spirostreptus spec.* konnten am N-Terminus zwei verschiedene Proteine ansequenziert werden, vollständige cDNA Klone wurden aber ebenfalls nicht gefunden. Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Es kann daher nur gemutmaßt werden, dass die RNA der zweiten Untereinheit instabiler ist und während der Umschreibung in cDNA leichter degradiert. Die Untersuchung eines anderen juliformen (*Julus spec.*), sowie eines glomeriden Diplopoden (*Glomeris spec.*) erbrachte keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines Hämocyanins. Vermutlich ist dies darin begründet, dass ausschließlich kleine, einheimische Arten untersucht wurden, die allein aufgrund ihrer Größe kein respiratorisches Protein benötigen, wohingegen es sich bei *Spirostreptus spec.* und *A. gigas* um Tausendfüßlerarten handelt, die sehr groß werden können (bei *A. gigas* bis zu 30 cm).

Wie zuvor erwähnt, konnten Mangum et al. die Existenz eines 36-meren Hämocyanins bei *S. coleoptrata* nachweisen (Mangum et al., 1985). Im Jahr 1999 konnten Markl und Gebauer zeigen, dass dieses Hämocyanin aus vier Untereinheitstypen besteht, welche sie mit HcA-D bezeichneten (Markl und Gebauer, 1999). Diese Untereinheiten kommen im nativen Protein in einem Verhältnis von A=2:B=2:C=1:D=1 vor. Diese Vermutung war durch ein zweidimensionales SDS-Gel (Abb. 3.4) bestätigt worden. Zu Beginn der Arbeit waren bereits drei der gesuchten Untereinheiten (HcA, C, D) sequenziert (Kusche, 2001; Hembach, 2002). Die hier durchgeführten Untersuchungen führten zur Aufklärung der

Sequenz der fehlenden Untereinheit HcB. Es war somit erstmals möglich, das Hämocyanin eines Myriapoden vollständig zu charakterisieren.

Die vier Hämocyanin-Untereinheiten zeigen Identitäten zwischen 49,5 - 55% (Tabelle 4.1), wobei 240 Aminosäuren strikt konserviert sind. Die meisten der konservierten Aminosäuren liegen im Bereich der Kupferbindungsstellen der Domäne 2 (Abb. 4.1). Diese sind für die Sauerstoffbindung von essentieller Bedeutung. Ein Austausch von Aminosäuren an dieser Stelle könnte zu einem Verlust der Funktion führen.

Neben den erwähnten Sequenzen wurde bei *S. coleoptrata* noch eine fünfte cDNA-Sequenz gefunden, welche für eine Hämocyaninuntereinheit codiert, die aber nicht im nativen Protein vorkommt (Hembach, 2002). Diese wurde mit HcX bezeichnet. Welche Funktion diese fünfte, hoch abgeleitete Untereinheit erfüllt, ist bislang nicht geklärt. Sie besitzt aber alle Histidine der Kupferbindungsstellen und es handelt sich eindeutig um ein Hämocyanin, nicht um ein Speicherprotein.

**Tabelle 4.1:** Identitäten zwischen den Hämocyaninuntereinheiten des Chilopoden *S. coleoptrata* und den Diplopoden *A. gigas* sowie *S. spec.*:

|               | <b>ScoHcB</b> | <b>ScoHcC</b> | <b>ScoHcD</b> | <b>ScoHcX</b> | <b>AgiHc1</b> | <b>SpiHc1</b> |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>ScoHcA</b> | 55,5          | 53,7          | 53,1          | 44,6          | 50,7          | 51,0          |
| <b>ScoHcB</b> |               | 53,0          | 49,5          | 48,1          | 45,7          | 46,0          |
| <b>ScoHcC</b> |               |               | 54,4          | 42,1          | 45,3          | 44,9          |
| <b>ScoHcD</b> |               |               |               | 43,3          | 46            | 45,3          |
| <b>ScoHcX</b> |               |               |               |               | 39,2          | 38,9          |
| <b>AgiHc1</b> |               |               |               |               |               | 94,8          |

Von *S. coleoptrata* und *Spirostreptus spec.* existierten zu Beginn der Arbeit bereits Sauerstoffbindungskurven (Mangum et al., 1985; Jaenicke et al., 1999). Für *A. gigas* wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biophysik ebenfalls der  $P_{50}$ -Wert des Hämocyanins, sowie der Hill-Koeffizient ermittelt. Der  $P_{50}$ -Wert gibt den Sauerstoffpartialdruck an, bei dem die Hälfte aller Hämocyaninuntereinheiten mit Sauerstoff gesättigt sind, und ist ein Maß für die Sauerstoffaffinität des Proteins. Je höher der  $P_{50}$ -Wert, desto geringer ist die Sauerstoffaffinität. Mit Hilfe des Hill-Koeffizienten, der ein Maß für die Kooperativität der Untereinheiten im Hämocyanin ist, lassen sich Aussagen über die Interaktion zwischen den Untereinheiten im Hämocyaninmolekül treffen. Je höher dieser Koeffizient ist, desto schneller kann das Hämocyaninmolekül be- bzw. entladen werden. Der  $P_{50}$ -Wert liegt im Falle von *S. coleoptrata* bei 55 Torr (Mangum et al., 1985), im Vergleich zu 8,7 Torr bei *A. gigas* und 4,7 Torr bei *Spirostreptus spec.* (Jaenicke et al., 1999). Dies bedeutet, dass das Hämocyanin des Spinnenläufers eine um etwa 6- bzw. 12-fach niedrigere Affinität für

Sauerstoff aufweist als die beiden untersuchten Spirostreptiden. Betrachtet man den Hill-Koeffizienten, so ergibt sich für *S. coleoprata* eine deutlich höhere Kooperativität ( $h = 8,9$ ) als für *S. spec.* und *A. gigas* ( $h = 1,3; 2,1$ ). Diese Werte resultieren möglicherweise aus einer Anpassung an die jeweilige Lebensweise. Der Spinnenläufer muss über ein Hämocyanin verfügen mit dem er eine schnelle Sauerstoffanlieferung ins Gewebe erreichen kann, da es sich hierbei um einen räuberisch lebenden Chilopoden handelt. Dazu ist ein hohes Maß an Kooperativität innerhalb der Hämocyaninuntereinheiten nötig. Eine hohe Affinität des Hämocyanins für Sauerstoff wäre eher hinderlich, da diese dem Effekt der Kooperativität entgegenwirken würde. Bei den beiden untersuchten Diplopoden handelt es sich um vegetarisch lebende oder aasfressende Arten, die keiner schnellen Bewegung bedürfen. Bei ihnen ist daher eine schnelle Sauerstofffreisetzung nicht notwendig. Die beiden Spirostreptiden sind aber häufig in den Boden eingegraben zu finden, was während der Häutungsphase bis zu mehreren Wochen andauern kann. Aufgrund der vorangehend beschriebenen Eigenschaften (höhere Affinität, geringere Kooperativität) kann man folglich davon ausgehen, dass es sich im Falle ihres Hämocyanins mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Sauerstoffspeicherprotein handelt. Diese eher ungewöhnliche Funktion war bislang für Hämocyanine nicht beschrieben.

|        |                                                                                            |        |        |        |       |        |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|-------|--------|
| ScoHcA | --MWSALATLFLVLTGIVRA-PQ---CPVPVATKDKLEKLEIGHVNRPLTETPEPAGY-----D-TKLKGGLPQHEIFSL           | 75     |        |        |       |        |
| ScoHcB | --MVAKVCVLAMCLVAVGA-P---KCPBRAT-DGAKOKRMLEVLQHVNFYVAETKDKIPAG-----SE-DVFKHLGLKHEVFSL       | 76     |        |        |       |        |
| ScoHcC | MGAMKWCFTFAITAIVAVKAYDEEAKCMSHDESQVKEROILHIVDSINKPISDFRADRGVI-----D-HKLRGLKHEVFSL          | 82     |        |        |       |        |
| ScoHcD | MDTRVRLTLALVALSGVLA-SESCSSAIVNYKLKQELQHVDTINKPYPDFKDTRGII-----D-SKLKGGLPFRVFSL             | 81     |        |        |       |        |
| ScoHcX | MKYCTESLTLTLAVIGCTSA-AINFKCPKGT-AEKKHKEELYDLVQRINRPLIQFKEPNFPTSFLIKGDPKEFFQAIHLPKKEVFSL    | 88     |        |        |       |        |
| SpiHc1 | ---MKFILAVVLATTATA-E---KCPKPV-NVEAKOKMVDTLISYINKPANVPKPP-I-----DP-KKLTIGGLPKDQVFSL         | 72     |        |        |       |        |
| AgiHc1 | ---MKFVLAVVLATTATA-E---KCPKPV-NVEAKOKMVDTLISYINKPANVPKPP-I-----DP-KKLTIGGLPKDQVFSL         | 72     |        |        |       |        |
|        | ***1.1***                                                                                  | 1.3    |        |        |       |        |
| ScoHcA | FDERFWDEATKAAEFMEATDEHEFTQRAVLRHRIINEDMEYANVAVLHRKQIRGVQVPRTHKLYPDKFLKQDILVEVREKVNHC--E    | 163    |        |        |       |        |
| ScoHcB | FDERQWDEATTAAYVMITAPSDEIDRAIVRHRINEDMEYAFSVAAVHRDDIRGINLPRIHELYPDKFLKHVVEVKNSINS--Q        | 164    |        |        |       |        |
| ScoHcC | FDERNWDEASKVRLTDAKDDFIDVAEVIRLRNEEFYAFSVAVMHRGDIQGLQVPRTHDLPDKFLVEDVHRLLELSNRGEHY          | 172    |        |        |       |        |
| ScoHcD | FDERNWDEAAKVELLEPKTEREFIHLDIIHHRNEDFYAFSVALAHRPDCGVQVPRLDLPDKFLRKEVHKHKEYSFEAYL            | 171    |        |        |       |        |
| ScoHcX | FDERHWDDEAMTAYEYLYEDELDDFIDIAKIYHLHNEDMFYVFSFAVLYRKDIRNVRLOHLYPDKFLTNDINKKQANYOS--K        | 176    |        |        |       |        |
| SpiHc1 | FDERTWDBVSEVLKRFMAPIFEDFIKVAETLYPHNEDLIFGLSVAIVHRPDANGVHVPRHEVYDPDKFLTNDVLINRKQIIKS--H     | 160    |        |        |       |        |
| AgiHc1 | FDERTWDBVSEVLKRFMAPIFEDFIKVAETLYPHNEDLIFGLSVAIVHRPDANGVHVPRHEVYDPDKFLTNDVLINRKQIIKS--H     | 160    |        |        |       |        |
|        | ***1.4***                                                                                  | 1.5*** | 1.6*** | 1.7*** |       |        |
| ScoHcA | EK-PVVDATTELHQNQLDPYRISYFLEDIGMNSHHYHWHVHPAVMLPKH---GP-RKGRKGLFYMHQMVARYDSERLSNNLPRTPE     | 248    |        |        |       |        |
| ScoHcB | ED-PLDATHEFTDLRDPISKHYFLEDVGLNSHHYHWHVHPAVMQESLEELTHQHKRKGLFYMHQMVARYDAERLSNGLPRSTT        | 253    |        |        |       |        |
| ScoHcC | DRI-PLDATQISNYLDPSELEYLEDLGLNSHHYHWHVHPA-WSEL---GN-EKGRKGLFYMHQMLARYEARMNSGLARTRT          | 258    |        |        |       |        |
| ScoHcD | DKVPV-DATFVSDNHLDPQELLYLEDLGLNSHHYHWHVHPA-WLPKH---GG-VKGRKGLFYMHQMVARYDTERLSNDLPVRVP       | 257    |        |        |       |        |
| ScoHcX | QH-PV-DATKEFDLRNPVSYLHYFLEDIGMNSHHYHWHVMNSALRKAYP-TESEKKFYRKGLFYMHQMLARYELERLSNGLPRCPT     | 264    |        |        |       |        |
| SpiHc1 | KN-PVVDKTHYYNDFDPFRRVDYFTEDEGNSHHYHWHVHPS-WTQDI---GE--KSKLGLFYMHQMVARYDFSELLSVHLPRISS      | 244    |        |        |       |        |
| AgiHc1 | KN-PVVDKTHYYNDFDPFRRVDYFTEDEGNSHHYHWHVHPS-WHQGV---GE--KAKLGLFYCMHROMVARYDFSELLSVHLPRISS    | 244    |        |        |       |        |
|        | 1B***                                                                                      | 2.1*** | 2.2*** |        |       |        |
| ScoHcA | FENWDDPLEGYAPHLTIHKTYGNYMFRPECLIVRDLPELNNKMRQVKSRIHGHILNVLVAENGTKISLDNE---HGIDLGLDALES     | 335    |        |        |       |        |
| ScoHcB | FENWDDPLETGYAPHLTIHTGYRQFRPDLVVRDLPELNNHMRQVDRILYVHRGEALAANGSSVSLRDE---RGIDGLNVMVES        | 340    |        |        |       |        |
| ScoHcC | FONWDDPLETGYAPHSIMKTGYTYAYRPPGYTLRLDPLNNKMYVEAKRVLYSTHSGIFHFSNGTDAHLDE---HGIDGLNVMVES      | 345    |        |        |       |        |
| ScoHcD | FENWDDPLETGYSPHLTIHKTYGNYMFRPPGYTLRLDPLNNKMYVEAKRVLYSTHSGIFHFSNGTDAHLDE---HGIDGLNVMVES     | 344    |        |        |       |        |
| ScoHcX | FENWDDPLETGYASHLAVDRITGYRITFRPDLVVRDLPELNNHMRQVDRIFDAATSCSVLRENGSFVKICRTFRYGLGNLGNLSEN     | 354    |        |        |       |        |
| SpiHc1 | LDDWKKVKIIGYAPHLTIHTGYTYMNRPELEIETDPELNGELMQRNRIMEIARHNITLKGSGKKLRTPTE-NGIDIFCHLAAAT       | 333    |        |        |       |        |
| AgiHc1 | LDDWKKVKIIGYAPHLTIHTGYTYMNRPELEIETDPELNGELMQRNRIMEIARHNITLKGSGKKLRVSPE-TGIDVFCHLAAAT       | 333    |        |        |       |        |
|        | 2B***                                                                                      | 2C***  | 2.3*** | 2D***  | 2E*** | 2.4*** |
| ScoHcA | LLSVNRALYGNICAHVMAARIADPDGRYGEDNGVMHDVATSARDPLFYWHKFIIDNLFLEYKDNLDPYQYETWPDVVLNDVTVKPH     | 425    |        |        |       |        |
| ScoHcB | LQSNRNPYGNVHCYAHVIAARIADPDCKYGEDNGMYDVATSARDPLFYWHKFIIDNLFHEYKDALKAYSSSETLYNDITIEEVNVQGE   | 430    |        |        |       |        |
| ScoHcC | LTSINRNPYGNVHCYAHVIAARIADPECKYGEDNGMYDVATSARDPLFYWHKFIIDNLFQYKNTLPPTYTEELT-PONSEFRVQG-IS   | 433    |        |        |       |        |
| ScoHcD | LLSVNRALYGNVHCYAHVIAAGVTDPOSTYGEKNGMYDVATSARDPLFYWHKFIIDNLFQEHKEILQDPYKNDENLFPDQVQVSLRINVA | 434    |        |        |       |        |
| ScoHcX | LTSINRNPYGNVHCYAHVIAARVTDPOCKYQOGNGMYDVATSARDPLFYWHKFIIDNLFQEHKEILQDPYKNDENLFPDQVQVSLRINVA | 443    |        |        |       |        |
| SpiHc1 | KNSTNRRYGNVHCYAHVIAARIADSDGEHEDNGMYDVATSARDPLFYWHKFIIDNLFQYQMLTPPTYPYQLTWPDVVDGIHLEN       | 423    |        |        |       |        |
| AgiHc1 | KNSSNRQYGNVHCYAHVIAARIADSDGEHEDNGMYDVATSARDPLFYWHKFIIDNLFQYQMLTPPTYPYQLTWPDVVDGIHLEN       | 423    |        |        |       |        |
|        | ***                                                                                        | 2.5*** | 2.6*** | 3.1*** | 3A*** |        |
| ScoHcA | K-GDY--DDEHTYVEVDNYEIGKGFDTYTRKTTATVKVRILQHEDYHYETIDNNAKAKAVFRIFLAPKYNEKGLFPVNEQRQLLVE     | 512    |        |        |       |        |
| ScoHcB | GGSP---ANTVITFLENSIVHDEGFSTARGHARKVQVQLHEGFNVOIKVNNAGGEHKVFRVFLAPKYDEEHFEFDNEQRGHAE        | 516    |        |        |       |        |
| ScoHcC | VGETSARDTYHYQHSLKVGQGFETKHTPAYKVKHLHESFETVYLOVE-NRRTRTGFFRIFAAPKYNELGQKWHINDORLIMVE        | 522    |        |        |       |        |
| ScoHcD | N-GTY--ENIVRTYQNSLFIKAGFTTTEGSVLYKVKHLHETIHYNLEVTNNALEEKGVVRIFGAVINDERGHPYITINDORHLVE      | 521    |        |        |       |        |
| ScoHcX | N-GR---KNEIHTFENDIMEISKHSETLNSDAKVKIQLHEKFEHLTVQNDKEEDTDLFRIFLPLEDESEHSELSIEMVRHAYD        | 529    |        |        |       |        |
| SpiHc1 | KTHE---ENMIHTYTSSTLRISKGFDTYKDSKAKVIVETDHDFFVYVTDNNARVETAVLRIFLAPKYDERGHPPLTKQORVMME       | 510    |        |        |       |        |
| AgiHc1 | KTHE---ENMIHTYTSSTFRISKGFDTYKDSKAKVIVETDHDFFVYVTDNNARVETAVLRIFLAPKYDERGHPPLTKQORVMME       | 510    |        |        |       |        |
|        | 3B***                                                                                      | 3C***  | 3D***  | 3E***  | 3F*** | 3.2*** |
| ScoHcA | LDKFEATLEPHNVIERQSK-SSVTN-SKQHVFEIR-NLADDHQCSCGWPYLLLPKGYEGMTYQLFVVTDTDEEDHVEDAGEQQR       | 600    |        |        |       |        |
| ScoHcB | LDKFEATVPAGSSTIEQHSK-SSVTOSNDFGSSA-TRSSNHCSCGWPYLLLPKGNHQGVQFNVYVITSTDEEDHVES-DESCHIG      | 603    |        |        |       |        |
| ScoHcC | MDKFEIKLYPKNTIETHSED-STVTSSASIFSDS-SEQSDHCSCGWPYLLLPKGNFEGFPMEVFVITVDEEDKVEGPDGACH         | 610    |        |        |       |        |
| ScoHcD | LDKFTVNLPGKNSVRQPCYN-SAVTAKYDVFGVE-SQKPOEGNCGWPYMLLPKGYEGLRFRVFAIVNHDEEDKVSQ-DETOLOG       | 608    |        |        |       |        |
| ScoHcX | TEKRVIPAPGSDIVISRSISGAPANKFFGSFEERYISEDNCNFSHCGWPYMLLPKGSQCTPFAFVMLTAEEDFTPNMDTCFCA        | 619    |        |        |       |        |
| SpiHc1 | LDKFKATLPGHNVVRRCSNE-SSVTNPVDHI-GDIT-RTVDEDHCHCGWPEYLLVFGQDYDGMHYELFVMTNYCEDQAQDTLSCKC-    | 597    |        |        |       |        |
| AgiHc1 | LDKFKAPLPGHNVVRRCSNE-SSVTNPVDHI-GDIT-QTVDEDHCHCGWPEYLLVFGQDYDGMHYELFVMTNYCEDQAQDMSCKC-     | 597    |        |        |       |        |
|        | 36***                                                                                      | 3H***  | 3I***  | 3.1*** | 3J*** | 3.5*** |
| ScoHcA | DSMSYCGSVEHKLPDNKPLGYPFDRRIDGTGFEFKTQNMYYGDDVVIQFTGEVTH-----                               | 656    |        |        |       |        |
| ScoHcB | DSLSYCGALYDKYDPRFP-GYPFDRHADAAQTFDKTKNNMSVTIKHTGEVDA-----                                  | 659    |        |        |       |        |
| ScoHcC | DALTYCGGIDYHFPDKRA-GYPFDRPTKQRNNAFKTKNNKGVTVDKFTGETAPEDFHNQH---                            | 673    |        |        |       |        |
| ScoHcD | DAVAYCGAHNQKYPDKKP-GYPFDRRIDERTTEHFIHPNMIATDVIKFTGEBFLPPKGD-----                           | 668    |        |        |       |        |
| ScoHcX | DSWSHCGSLFIQYPENVE-GYPFQPIIECTKEEFALPNIAKQEVIIKFTGETKDSPLVTQLEND                           | 685    |        |        |       |        |
| SpiHc1 | HAHSYCGNIGELYDKRPLGYPFDRKIKATGWAEFKTQNMCDADIVIKFSKKNNDH-----                               | 653    |        |        |       |        |
| AgiHc1 | HAHSYCGNIGELYDKRPLGYPFDRKIKATGWAEFKTQNMCDTIVIKFSKKNNAQ-----                                | 653    |        |        |       |        |
|        | 3.6***                                                                                     | 3K***  |        |        |       |        |

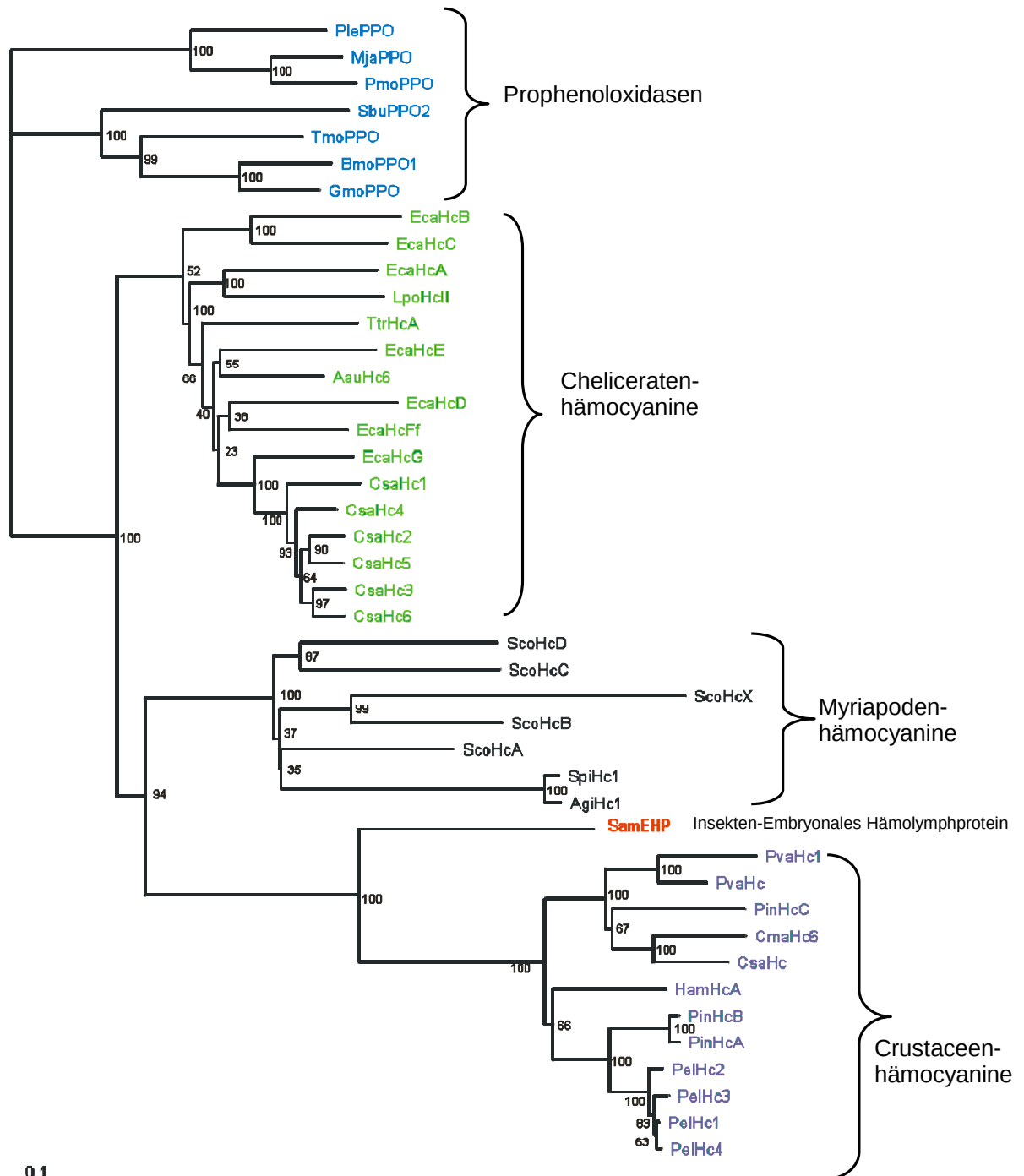
**Abb. 4 1:** Alignment der Aminosäuresequenzen der Hämocyaninuntereinheiten HcA-D und HcX von *S. coleotrata*, Hc 1 von *A. gigas* und *S. spec.*

Rot = 100 %ige Sequenzidentität; Blau = 75%ige Sequenzidentität; Grün = 50%ige Sequenzidentität. Die Signalpeptide sind unterstrichen. Die  $\alpha$ -Helix 1.2 fehlt. ScoHcA-D, X: *S. coleoprata* Hämocyaninuntereinheiten A bis D, X; SpiHc1: *Spirostreptus spec.* Hc1; AgiHc1: *A. gigas* Hc1.

#### 4.1.2 Phylogenie der Myriapoden-Hämocyanine

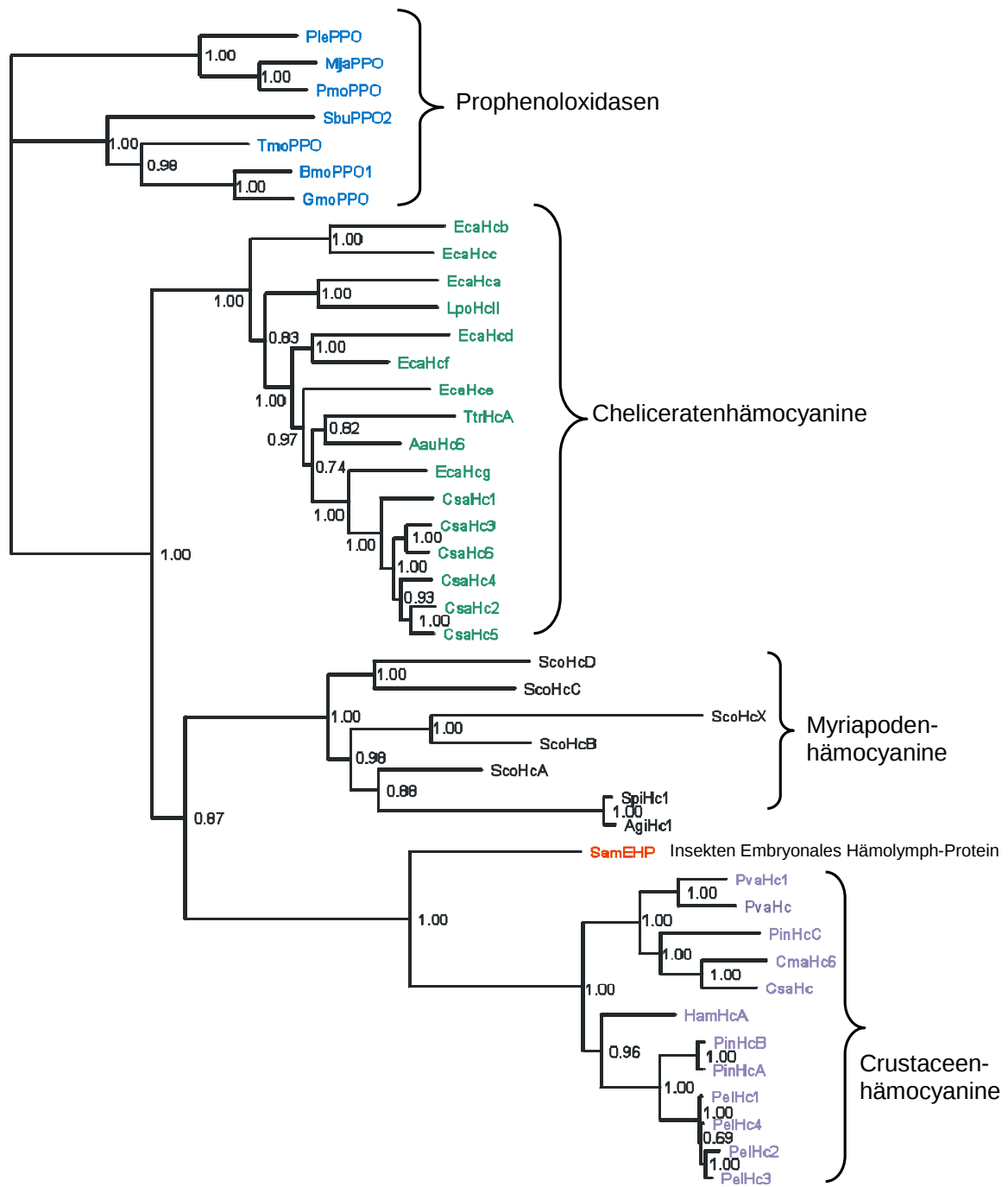
Unter Einbeziehung der cDNA-Sequenzen der identifizierten Hämocyaninuntereinheiten von *A. gigas* und *S. coleoptrata* wurden mittels Neighbor-joining und Bayes'scher Analyse molekulare Stammbäume erstellt (Abb. 4.2 und 4.3). Als Außengruppe wurden die Prophenoloxidasen gewählt, da diese basal zu den Hämocyaninen angeordnet sind (Burmester, 2001; Immesberger und Burmester, 2003). Die Stammbäume lassen sich so interpretieren, dass innerhalb der Myriapoda die Hämocyaninuntereinheit A von *S. coleoptrata* mit den Untereinheiten 1 des Hämocyanins von *Spirostreptus spec.* und *A. gigas* gruppiert, daher ist hier von einer Orthologie auszugehen. Nach Neighbor-joining ist dieser Zweig nur schwach unterstützt (Bootstrapwert 37), bessere Unterstützung ist jedoch nach der Bayes'schen Methode gegeben (0,88). Die Hämocyaninuntereinheiten HcB und HcX von *S. coleoptrata* bilden einen gemeinsamen Ast und spalten sich zusammen mit der Untereinheit HcA ab, wohingegen sich der Ast, der zu den Hämocyaninunterheiten HcC und HcD führt, früher abspaltet. Diese Ergebnisse sind dahingehend zu deuten, dass sich die Differenzierung des Hämocyanins in verschiedene Untereinheiten bereits vor der Trennung der Diplopoden und der Chilopoden vor etwa 450 Millionen Jahren ereignet hat (Nielsen et al., 1997). Während sich bei den (untersuchten) Diplopoden anscheinend nur zwei verschiedene Untereinheitstypen entwickelten, waren es bei *S. coleoptrata* fünf, von denen aber nur vier eine Funktion im nativen Hämocyanin innehaben.

Die phylogenetischen Untersuchungen ergaben darüber hinaus mit beiden Methoden eine 100% Unterstützung der Monophylie der Myriapodenhämocyanine (Bootstrap 100; Bayes, 1.0). Die Stammbaumanalysen unterstützen ein gemeinsames Taxon von Insekten und Crustaceen (100/1.0). Die Myriapoden stehen als Schwestergruppe zu beiden (94/0.7) und bilden mit ihnen gemeinsam die Mandibulata. Die Cheliceraten stehen in den Stammbäumen basal dazu (100/1.0). Beide Stammbäume unterstützen damit die Pancrustacea-Hypothese (z.B. Regier und Shultz, 1992; Boore et al., 1995; Hwang et al., 2001), die eine Schwestergruppenstellung der Insekten zu den Crustaceen postuliert. Diese Hypothese wird der ursprünglich bestehenden Tracheata-Hypothese gegenübergestellt, die sich in erster Linie auf morphologische Merkmale (z.B. die Tracheensysteme bei Myriapoden und Insekten) stützt und eine Schwestergruppenstellung der Insekten zu den Myriapoden annimmt (z.B. Snodgrass, 1938; Wheeler, 1993, 2001).



Legende siehe nächste Seite

**Abb. 4.2: Phylogenetische Position der Hämocyaninuntereinheiten der Myriapoden innerhalb der Arthropodenhämocyanine.** Der Stammbaum wurde mit der Neighbor-joining Methode erstellt. Die Prophenoloxidasen (blau) bilden die Außengruppe. PlePPO: *Pacifastacus leniusculus* Prophenoloxidase; PmoPPO: *Penaeus monodon* Prophenoloxidase; MjaPPO: *Marsupaeus japonicus* Prophenoloxidase; SbuPPO2: *Sarcophaga bullata* Prophenoloxidase 2; TmoPPO: *Tenebrio molitor* Prophenoloxidase; BMO PPO1: *Bombyx mori* Prophenoloxidase 1; GmoPPO: *Galleria mellonella* Prophenoloxidase; EcaHca-g: *Eurypelma californicum* Hämocyanin-Untereinheiten a-g; LpoHcII: *L. polyphemus* Hämocyanin- Untereinheit II; TtrHcA: *Tachypleus tridentatus* Hämocyanin-Untereinheit A; AauHc6: *Adroctonus* Hämocyanin-Untereinheit 6; CsaHc1-6: *Cupiennius salei* Hämocyanin-Untereinheiten 1-6. ScoHcA-D, X: *Scutigera coleotrata* Hämocyanin- Untereinheiten A-D, X; SpiHc1: *Spirostreptus spec.* Hämocyanin-Untereinheit 1; AgiHc1: *A. gigas* Hämocyanin-Untereinheit 1; SamEHP: *Schistocerca americana* Embryonic Hemolymph Protein; Pennaeus vanae: *Pennaeus vanae* Hämocyanin, Hämocyanin -Untereinheit 1; PinHcA-C: *Panulirus interruptus* Hämocyanin-Untereinheiten A-C; CmaHc6: *Cancer magister* Hämocyanin-Untereinheit 6; CsaHc: *Callinectes sapidus* Hämocyanin; HamHcA: *Homarus americanus* Hämocyanin-Untereinheit A; Pel Hc1-4: *Palinurus elephas* Hämocyanin-Untereinheiten 1-4.



0.1

**Abb 4.3: Phylogenetische Position der Häemocyaninuntereinheiten der Myriapoden innerhalb der Arthropodenhäemocyanine.** Der Stammbaum wurde mit der Bayes'schen Methode erstellt. Legende siehe vorherigen Stammbaum.

## 4.2 Hämocyanine der Cheliceraten

Die Cheliceraten werden in zwei Hauptklassen unterteilt; man unterscheidet die Merostomata und die Arachnida. Während innerhalb der Merostomata rezent nur noch die Ordnung der Xiphosuren existiert, umfasst die Klasse der Arachniden eine Vielzahl von Arten. Bei dem im Rahmen der Arbeit untersuchten *Limulus polyphemus* handelt es sich um einen Vertreter der Xiphosura. Von besonderem Interesse ist diese Ordnung vor allem deshalb, weil sie innerhalb der Cheliceraten als basal angesehen wird, und ihre Vertreter sich seit dem Silur (436-408 MYA) morphologisch kaum verändert haben. Die Aufklärung der Hämocyaninuntereinheiten von *L. polyphemus* könnte daher zu einem besseren Verständnis der frühen Evolution der Hämocyanine innerhalb der Cheliceraten, vor allem bezüglich der Diversifikation der Hämocyaninuntereinheiten, beitragen. Aus diesem Grund ist der Pfeilschwanzkrebs schon seit langer Zeit Gegenstand intensiver Forschung und es existieren sehr viele Daten bezüglich Struktur, Aufbau und Zusammenspiel seiner Hämocyaninuntereinheiten (z.B. Kempter et al., 1985; Lamy et al., 1983). Die Sequenzdaten innerhalb der Xiphosuren waren hingegen spärlich. Es lagen lediglich Sequenzierungen der Hämocyaninuntereinheit II von *L. polyphemus* (Nakashima et al., 1986), sowie der Untereinheit I von *T. tridentatus* (Linzen et al., 1985), ein weiterer Vertreter der Xiphosuren) auf Aminosäureebene vor.

Innerhalb der Klasse der Arachniden sind mittlerweile die vollständigen Sequenzen der Hämocyaninuntereinheiten von drei verschiedenen Spinnenarten aufgeklärt (Voit et al., 2000; Ballweber et al., 2002; Averdam et al., 2003). Darüber hinaus war beim Skorpion *Androctonus australis* die Hämocyaninuntereinheit 6 vollständig sequenziert worden (Buzzy et al., 1995). Damit war die Grundlage geschaffen, die Verwandtschaftsbeziehungen der Hämocyaninuntereinheiten innerhalb der Cheliceraten zu untersuchen. Die Aufklärung von Sequenzen der Hämocyaninuntereinheiten bei *L. polyphemus* sollte dazu beitragen, mehr über die Evolution der Hämocyanine innerhalb der Cheliceraten aussagen zu können.

### 4.2.1 Die Hämocyaninuntereinheiten von *Limulus polyphemus*

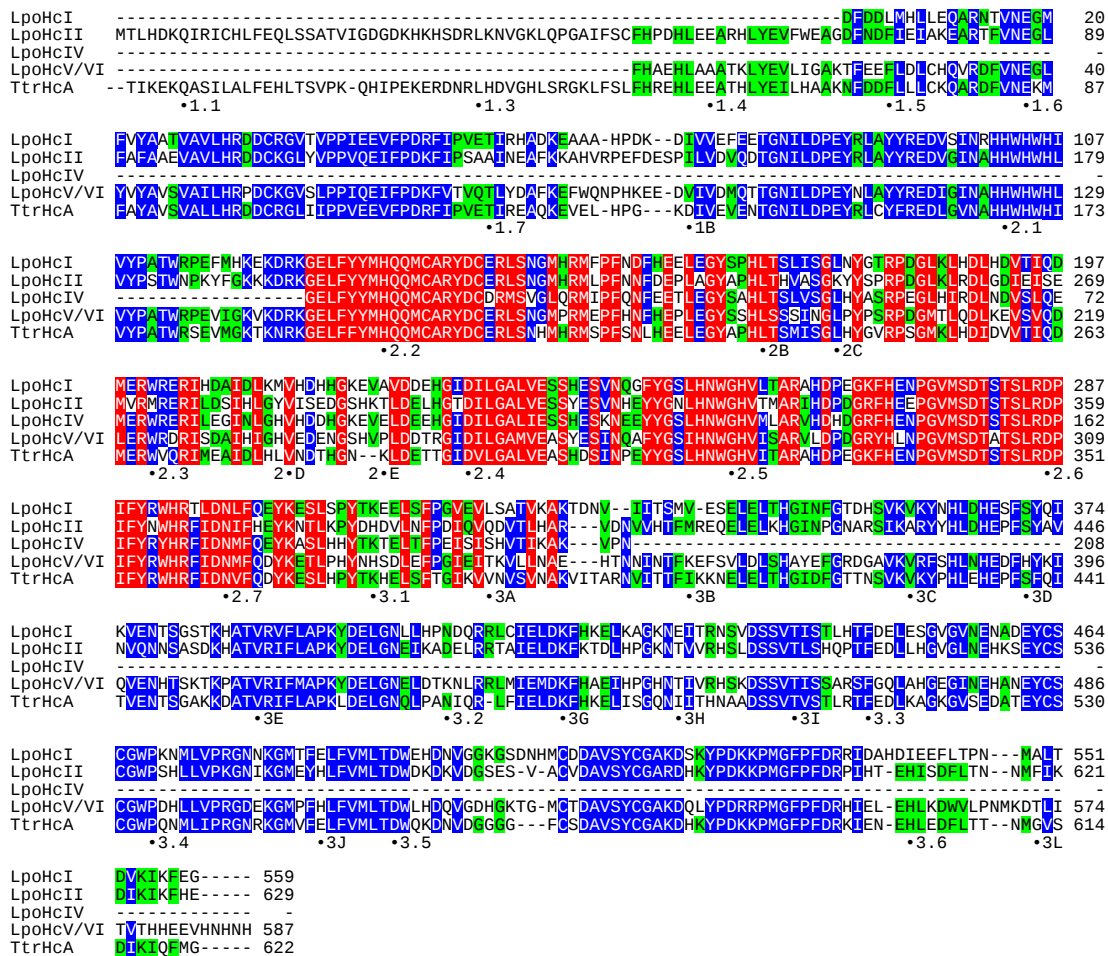
Die Hämocyanine der Xiphosuren bestehen aus einem 8x6-mer, das aus zwei identischen Hälften zusammengesetzt ist (Markl, 1986). Diese entsprechen jeweils strukturell den 4x6-meren bei Spinnenhämocyaninen (Markl, 1986; Markl und Decker, 1992). Das 8x6-

mere Hämocyanin bei *L. polyphemus* besteht aus acht verschiedenen Untereinheiten, die im nativen Protein als Monomere (I; IV), als Homodimere (II; IIa; IIIa; IIIb) und als Heterodimere (V; VI) vorkommen (Markl et al., 1981; Topham et al., 1999). Einige dieser Untereinheiten konnten hier nun zumindest teilweise auf cDNA-Basis sequenziert werden. Die Zuordnung der Hämocyaninuntereinheiten erfolgte dann mit Hilfe von NCBI-BLAST über den Vergleich mit den bereits bekannten Hämocyaninsequenzen von Xiphosuren, bzw. von Arachniden. Hierbei konnte eine Sequenz der Hämocyaninuntereinheit E von *E. californicum* zugeordnet werden. Da in dieser Arbeit die Nomenklatur nach Lamy benutzt wird (Lamy et al., 1983) entspricht dieses der Untereinheit I. Die zweite Hämocyaninsequenz entsprach der als Aminosäuresequenz vorliegenden Untereinheit II von *L. polyphemus*. Die dritte Sequenz zeigte die größte Sequenzähnlichkeit mit der Hämocyaninuntereinheit D von *E. californicum* (HcIV), während die vierte der Untereinheit B oder C (folglich HcV oder VI) zugeordnet wurde. Um welche der beiden es sich handelt, kann erst nach der Vervollständigung der cDNA am 5'-Ende entschieden werden.

Die vollständige Sequenz der Hämocyaninuntereinheit II von *L. polyphemus* weist, wie bei allen Cheliceraten, jedoch im Gegensatz zu den Hämocyaninuntereinheiten der Myriapoden, Crustaceen und Insekten, kein Signalpeptid auf, da das Hämocyanin bei den Cheliceraten direkt aus Hämocyten freigesetzt wird. Daher wird kein Signalpeptid zum Transport aus dem endoplasmatischen Retikulum benötigt (Fahrenbach, 1970). Diese Untereinheit II war, wie erwähnt, bereits auf Aminosäureebene sequenziert worden (Nakashima et al., 1986). Die Sequenz, die hier aufgeklärt werden konnte, ist bis auf einen Aminosäureaustausch mit dieser Hämocyanineinheit identisch. Der Austausch ist entweder durch das Vorhandensein verschiedener Allele bei unterschiedlichen Individuen zu erklären oder auf einen Fehler bei der Sequenzierung zurückzuführen. Die Ergebnisse, die hier diskutiert werden, sind als Teilergebnisse zu betrachten. Die übrigen Sequenzdaten werden momentan innerhalb der Arbeitsgruppe erarbeitet.

Wie Abb. 4.4 zeigt, sind in den Hämocyaninsequenzen aller Untereinheiten die Bereiche der Sauerstoffbindungsstellen CuA und CuB hoch konserviert. Die  $\alpha$  1.2 Domäne fehlt hier, wie auch bei den Myriapoden und Onychophoren. Inwieweit dies für die Analyse verwandtschaftlicher Beziehungen herangezogen werden kann, ist noch nicht klar. Betrachtet man die (als gesichert geltende) basale Stellung der Onychophoren (Westheide/Rieger, 2003) und unterstellt man die Pancrustacea- und Mandibulata-Hypothesen (erstere postuliert ein Schwestergruppenverhältnis der Crustaceen und Hexapoden, zweite sagt aus, dass diese beiden ein monophyletisches Taxon zusammen mit den Cheliceraten bilden), so müsste die Deletion der  $\alpha$  1.2 Domäne beim letzten gemeinsamen

Vorfahren der Arthropoden bereits vorhanden gewesen sein. Beim gemeinsamen Vorläufer der Crustaceen und Insekten hätte sich eine  $\alpha$  1.2 Domäne entwickelt



**Abb. 4.4:** Alignment der Aminosäuresequenzen der Hämocyaninuntereinheiten des *L. polyphemus* HcI, II, IV und V/VI mit der Hämocyaninuntereinheit HcA von *Tachypleus tridentatus*. Bei den Limulushämocyaninsequenzen HcI, IV und V/VI handelt es sich um Teilsequenzen. Rot = 100 %ige Sequenzidentität; Blau = 75%ige Sequenzidentität; Grün = 50%ige Sequenzidentität. Die  $\alpha$ -Helix 1.2 fehlt. LpoI, II, IV und VI: *L. polyphemus* Hämocyaninuntereinheiten I, II, IV, VI. TtrHcA: *Tachypleus tridentatus* Hämocyaninuntereinheit A.

#### 4.2.2 Phylogenie der Cheliceratenhäemocyanine

Die erarbeiteten Häemocyaninsequenzen wurden benutzt, um mittels Neighbor-joining, sowie nach der Bayes'schen Analyse Stammbäume zu erstellen (Abb. 4.5 und 4.6).

Hierbei steht die Untereinheit V bzw. VI mit guter statistischer Unterstützung (Bootstrap-Wert 98, Bayes 1.00) in beiden Stammbäumen als Schwestergruppe zu den Häemocyaninuntereinheiten B von *E. californicum* sowie *N. inaurata* und zur Untereinheit C von *E. californicum*. Die Häemocyaninuntereinheiten bilden einen gemeinsamen basalen Ast zu den übrigen Häemocyaninuntereinheiten. Diese Einordnung wird durch immunologische und strukturelle Untersuchungen unterstützt (Kempster et al., 1985; Markl, 1985). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aufspaltung der Untereinheiten B und C in den Arachniden erst nach deren Trennung von den Xiphosuren (Merostomata) vor etwa 450 MYA (Dunlop und Selden, 1997) erfolgte. Bei *L. polyphemus* erfolgte die Aufspaltung in die beiden Untereinheiten konvergent dazu. Bei allen übrigen Häemocyaninuntereinheiten in den Stammbäumen hingegen ist das nicht der Fall. Hier stehen die Untereinheiten von *L. polyphemus* in beiden Bäumen jeweils basal zu den Häemocyaninen der Arachniden und haben ihre jeweilige Entsprechung, ein Umstand, der sich gut in die bestehenden Erkenntnisse einordnet (z.B. Markl, 1986).

Die Berechnungen ergaben in beiden Stammbäumen eine hohe Unterstützung (100/1.00) der Orthologie des *L. polyphemus* Häemocyanin II mit dem Häemocyaninunterheitentyp A von *E. californicum* und *N. inaurata*. Dies entspricht auch den Ergebnissen bisheriger Untersuchungen (z.B. Lamy, 1986; Markl, 1986; Averdam, 2003).

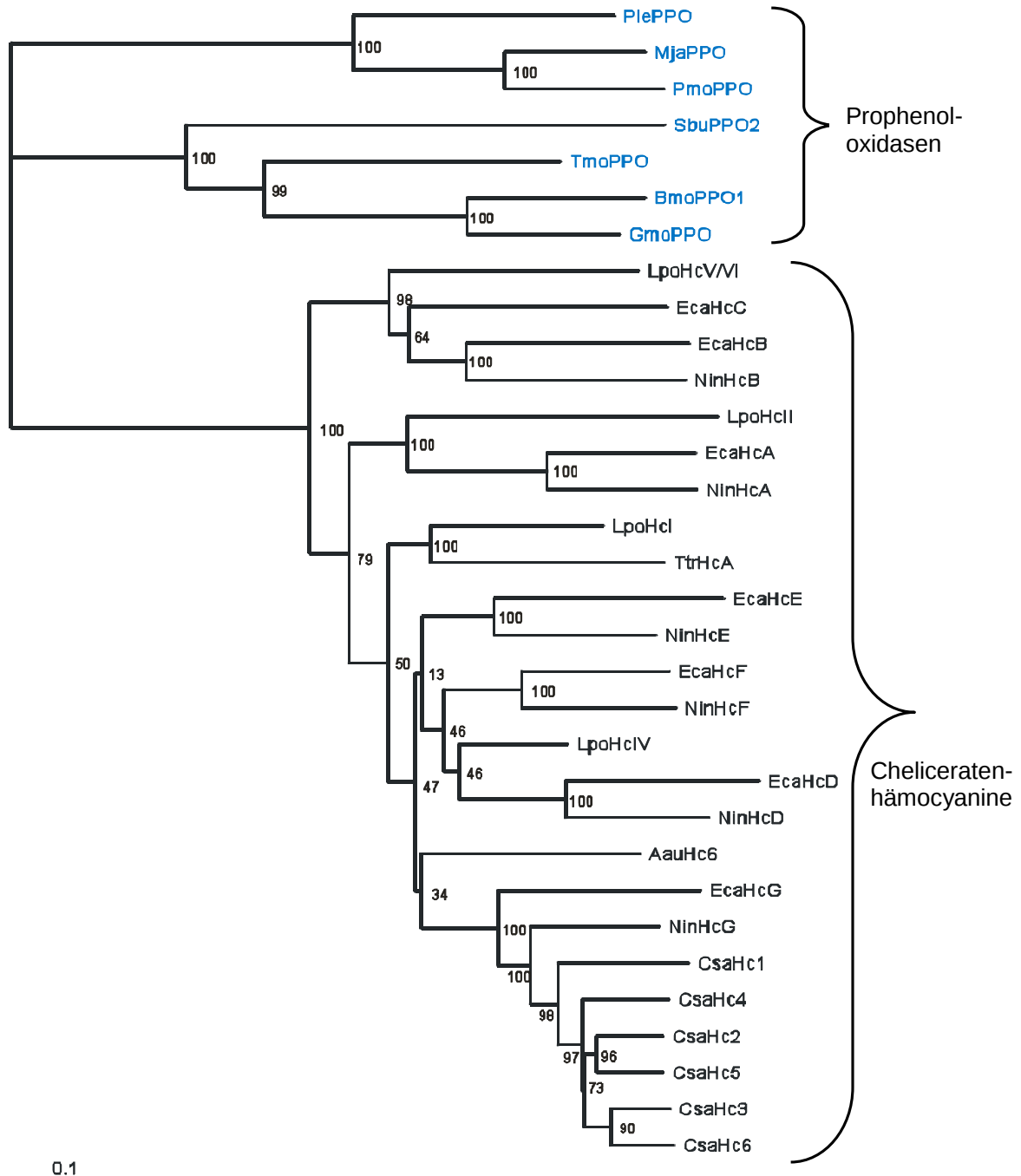
Die Untereinheit IV von *L. polyphemus* gruppiert in beiden Bäumen mit den Häemocyaninuntereinheiten D von *E. californicum* (Voit et al., 2000) und *N. inaurata* (Averdam et al., 2003), wenn auch mit unterschiedlicher Unterstützung. Während im Stammbaum nach Neighbor-joining ein solches Schwestergruppenverhältnis nur mit einem Bootstrap-Wert von 46 unterstützt wird, ist es in der Bayes'schen Analyse mit 0.99 statistisch gut abgesichert. Auch Lamy postulierte die Orthologie der Untereinheit IV von *L. polyphemus* mit der Untereinheit D von *E. californicum* (Lamy, 1983). Die Untereinheit IV bildet darüber hinaus gemeinsam mit den Häemocyaninuntereinheiten D der Spinnen eine Schwestergruppe zu den Häemocyaninuntereinheiten F von *E. californicum* und *N. inaurata*. Diese nahe Verwandtschaft wurde bereits zuvor beschrieben (Markl et al., 1984; Averdam et al., 2003).

Bei der Häemocyaninunterheit I von *L. polyphemus* weichen die Stammbäume voneinander ab. Beide unterstützen (100/1.00) das Schwestergruppenverhältnis der Untereinheit I mit der Häemocyaninuntereinheit A von *T. tridentatus*. Diese Einordnung wird auch von anderen Untersuchungen bestätigt (Averdam et al., 2003). Im Stammbaum nach Bayes bilden diese Untereinheiten die Schwestergruppe zur Häemocyaninuntereinheit 6 von *A. australis* (0.95) und stehen

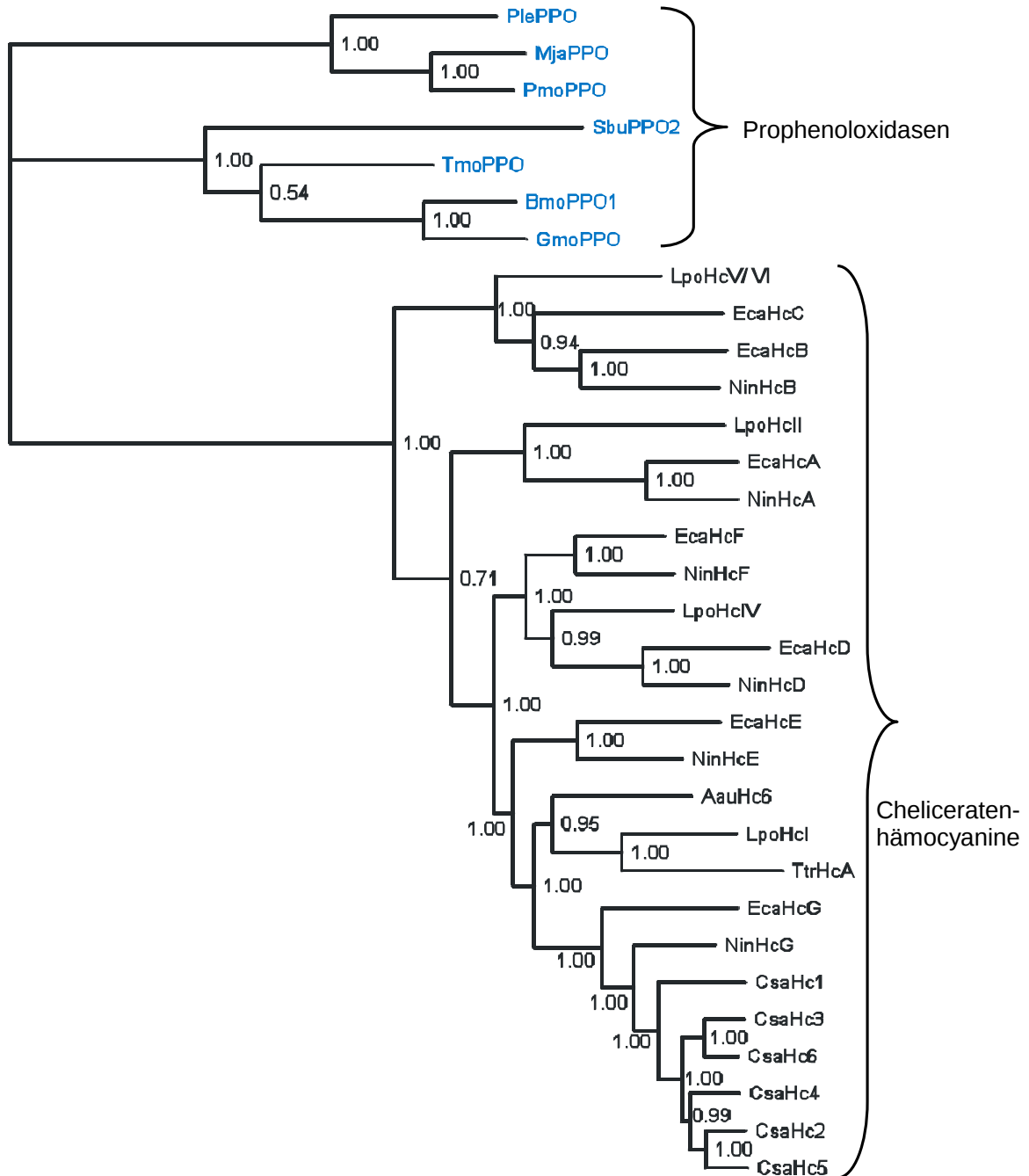
basal zu den Untereinheiten G von *N. inaurata* und *E. californicum*. Dies würde ebenfalls weitgehend den Ergebnissen von Averdam et al. entsprechen (Averdam et al., 2003), mit dem Unterschied, dass das Hämocyanin von *A. australis* dort basal zu den Hämocyaninuntereinheiten E steht, diese Untereinheiten jedoch im hier vorliegenden Stammbaum vorher abzweigen. Gemäß dem Neighbor-joining-Stammbaum stehen die beiden Untereinheiten, allerdings mit geringer Unterstützung (Bootstrapwert 50), basal zu den Untereinheiten E, F, D und G von *E. californicum* und *N. inaurata*. Die Hämocyaninuntereinheit 6 von *A. australis* zweigt hier viel später ab, steht jedoch ebenfalls basal zu den Untereinheiten G der Spinnenhämocyanine. Da es sich bei der Neighbor-joining Methode um eine Matrix-orientierte Methode handelt, ist es hier lediglich möglich, die Ähnlichkeiten zwischen zwei gegebenen Sequenzen zu vergleichen. Mit der Bayes'schen Analyse, die Charakter-orientiert arbeitet, kann man hingegen mehr Informationen aus den Sequenzen erhalten. Es ist daher davon auszugehen, dass diese Analyse zumeist exaktere Ergebnisse liefert. Da sich im Falle der dargestellten Bäume die Ergebnisse widersprechen, ist aus oben genannten Gründen der Stammbaum nach Bayes wahrscheinlicher, zumal er sich gut in bereits vorhandene Ergebnisse einordnet, die z.T. auf Sequenzdaten beruhen.

Die Hämocyaninuntereinheit 1 von *Cupiennius salei* schließlich ist den G-Untereinheiten von *E. californicum* und *N. inaurata* ortholog, was ebenfalls von früheren Untersuchungen bestätigt wird (Ballweber et al., 2002; Averdam, 2003).

Die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchungen fügen sich weitgehend in das bisherige, aufgrund von Strukturuntersuchungen und immunologischen Studien erarbeitete Bild der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Hämocyaninuntereinheiten bei verschiedenen Gruppen der Cheliceraten ein (z.B. Markl et al., 1979; Lamy et al., 1983; Kempter et al., 1985; Markl, 1986; Buzy et al., 1995). Es bleibt abzuwarten, ob dies in gleichem Maße für die bislang noch fehlenden Untereinheiten gilt.



**Abb. 4.5: Phylogenetische Position der Hämocyaninuntereinheiten von *L. polyphemus* innerhalb der Cheliceratenhämocyanine.** Der Stammbaum wurde mit der Neighbor-joining Methode erstellt. Die Prophenoloxidasen (blau) bilden die Außengruppe. PlePPO: *Pacifastacus leniusculus* Prophenoloxidasen; PmoPPO: *Penaeus monodon* Prophenoloxidasen; MjaPPO: *Marsupeaeus japonicus* Prophenoloxidasen; SbuPPO2: *Sarcophaga bullata* Prophenoloxidasen 2; TmoPPO: *Tenebrio molitor* Prophenoloxidasen; BmoPPO1: *Bombyx mori* Prophenoloxidasen 1; GmoPPO: *Galleria mellonella* Prophenoloxidasen; LpoHcI, II, IV, V/VI: *L. polyphemus* Hämocyanin-Untereinheiten I,II,IV und V/VI; EcaHcA-g: *E. californicum* Hämocyanin-Untereinheiten a-g; NinHcA-g: *N. inaurata* Hämocyanin-Untereinheiten a-g; TtrHcA: *Tachypleus tridentatus* Hämocyanin-Untereinheit A; CsaHc1-6: *Cupiennius salei* Hämocyanin-Untereinheiten 1-6.



0.1

**Abb. 4.6:** Phylogenetische Position der Hämocyaninuntereinheiten von *L. polyphemus* innerhalb der Cheliceratenhämocyanine. Der Stammbaum wurde mit der Bayes'schen Methode erstellt.

Legende siehe vorherigen Stammbaum.

### 4.3 Hämocyanine der Crustaceen

Innerhalb der Crustaceen wurden in allen bisher untersuchten malakostraken Crustaceen (Vertreter der Eucarida und der Peracarida; die systematische Einteilung wurde nach dem Taxonomy Browser des NCBI vorgenommen) Hämocyanine gefunden, während sie außerhalb dieser Gruppe wohl nur bei einzelnen Vertretern vorkommen (Remipedia, Yager, 1991; Cirripedia, Herberts und de Frescheville, 1981). Die bislang aufgeklärten Hämocyaninsequenzen wurden alle innerhalb der Decapoda erarbeitet (z.B. Durstewitz und Terwilliger, 1997; Kusche und Burmester, 2001; Kusche et al., 2003), wohingegen Sequenzdaten von anderen malakostraken Crustaceen noch nicht existierten. Die Hämocyanine der bisher untersuchten nichtdekapoden Amphipoda, Isopoda (Peracarida) und Euphausicea (Eucarida) sind Monohexamere, die nur aus Untereinheiten des  $\alpha$ -Typs bestehen (Berthet et al., 1965; Markl, 1986; Chan und Weeks, 1991). Um Aufschluss über die Evolution der Hämocyaninuntereinheiten innerhalb der malakostraken Crustaceen zu erhalten, sollte bereits im Rahmen von vorhergehenden Arbeiten die DNA-Sequenz einer Hämocyaninuntereinheit von *G. roeseli* aufgeklärt werden (Hembach, 2002). Dieses wäre die erste Sequenz einer Hämocyaninuntereinheit, die außerhalb der dekapoden Krebse aufgeklärt ist. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur Teile einer solchen Sequenz vorlagen, wurden die diesbezüglichen Untersuchungen fortgesetzt.

#### 4.3.1 Das Hämocyanin von *Gammarus roeseli*

Obwohl es bei dekapoden Malakostraken bereits problemlos gelungen war verschiedene Untereinheiten zu sequenzieren (z.B. Kusche et al., 2003), war es bei dem zu den Amphipoden (Peracarida, Malakostraka) gehörenden Flußflohkrebs *G. roeseli* mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden eine Hämocyaninuntereinheit auch nur in Teilen zu identifizieren. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren bereits einige Sequenzfragmente bekannt, die alle am 5'-Ende nicht komplett waren (Hembach, 2002). Mittels 5'-RACE gelang es dann, das fehlende 5'-Ende einer Sequenz zu identifizieren. Leider konnte die Sequenz keiner bereits vorhandenen sicher zugeordnet werden und auch alle Versuche, sie zu vervollständigen, blieben erfolglos. Warum sich die Identifikation der Sequenz der Hämocyanin-Untereinheit von *G. roeseli* so extrem schwierig gestaltete, kann lediglich gemutmaßt werden. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist das Gewebe des Flußflohkrebses sehr reich an RNAsen, die während dem RT-Schritt ein vollständiges Umschreiben der RNA in cDNA verhindern. Die im Alignment abgebildete, letztendlich aus vier leicht unterschiedli-

chen cDNA-Fragmenten zusammengesetzte Hämocyaninuntereinheit von *G. roeseli* zeigt eine sehr hohe Sequenzidentität mit der Hämocyaninuntereinheit A des dekapoden Malakotraken *Palinurus interruptus* auf (Abb. 4.7). Vor allem die Bereiche der Kupferbindungsstellen CuA und CuB sind stark konserviert. Ein Alignment der Sequenzen auf cDNA-Ebene ist dem Anhang (7.10.1) zu entnehmen.

```

PinHcA.-----DALGTENAKQODINHLCKTYEPTKYPDLKETAEFNPLGDTSTYDHGAAYETLMKELDHRLLERQH 70
GroHc  MKLLLLCLAATSAFAWPSFENDAAPSAVRQQAVNHLLYRVTEPLREFDLKVASFNPVADKSTYTDGGVAQLVDELTDHRLLEHH 90

PinHcA  WYSLFNTQRKEALMLFAVLNQKEMYCERSNAAYFRERMNEGEFVYALYVSVIHSKLGDGIVLPPLYEITPHMFTNSEVIDKAYSAAMT 160
GroHc  WYSLFNTQRKEALMLFDVLTHSKTWETALNNAAYFREOMNEGEFVYALYAAVIHSKLGAGIVLPPLYEVTPHLFTNSEVIQKAYAAQMT 180

PinHcA  QKQGTFNVSTFTGTTKNREQRVAYFGEDIGMNIHVTWMDFFPWEDSYGYHLDRKGELFFWVHHQLTARFDERLSNLDVDELWDR 250
GroHc  QTFGSFKQDFTGSKKNREQRVAYFGEDIGMNVHVTWHLDFPFWEDSYGYHLDRKGELFFWVHHQLTARFDERLSNLDVDELWDR 270

PinHcA  LIREGFAPLTSYKYGGEFFVRPDNIHFEDVDGVAHVDLLETTESRIEATDHGYITDSGGTTIDIRPKGTELLGDIIESSYSSNVQYY 340
GroHc  PIKEGFAPATYRYGGEFFVRPDNVHFEDVDGVVRVDMILHETRIKGAIAHGYITAADGSININDHGLDGLDIESSLYSSNAQYY 360

PinHcA  GSLHNTAHVMLGRQDPHGKFNLPPEVMEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFKKHTDSPPYTHDNLEFSGMVNVGVAIDGELITFFDEFQ 430
GroHc  GALHNAHIILGRQDPHGKFNLPPEVMEHFETATRDPAFFRLHKYMDNMFKHDSLA PYTAEI GFGVHLTSVIEGELITFFDEFQ 450

PinHcA  YSLINAVDSGENTIEDVEINARVHRLNHKEFTYKITMS--NNDGERLATRIFLCPIEDNNGITLTLDEARWCIEDLKFFQKVPKGPET 518
GroHc  YDLKAVDSSEVVEVEKAVDRLNHKDFAYNFIISDSADQHAVRVVFLCPRRDNNGIOETDEGRWNCIEMDKFWTKLAAGNN 540

PinHcA  LERSSDSSVTVPDMPFSQSLKEQADNAVNGCHLDLSAYERSCGIPDRMLLPKSPGEMFNLYVAVTDGDKDTIEGHNGCHDYGTHA 607
GroHc  LKRKSESSVTVPDVPSFASLHDADAAYASGSDLHLEFDRACGLPQRMLLPKTEEGLEFLLVAVSDGTTDAQHDALFAVDHGHHA 629

PinHcA  QCGVHGEYYPDNRPLGYPLERRIPDERVIDGVSNIKVWVKIVHLEHHD 657
GroHc  QCGVNGEYYPDHCPMGFPLDRRIPDDRIQLSADNIEKLLVTVTHKH----- 675

```

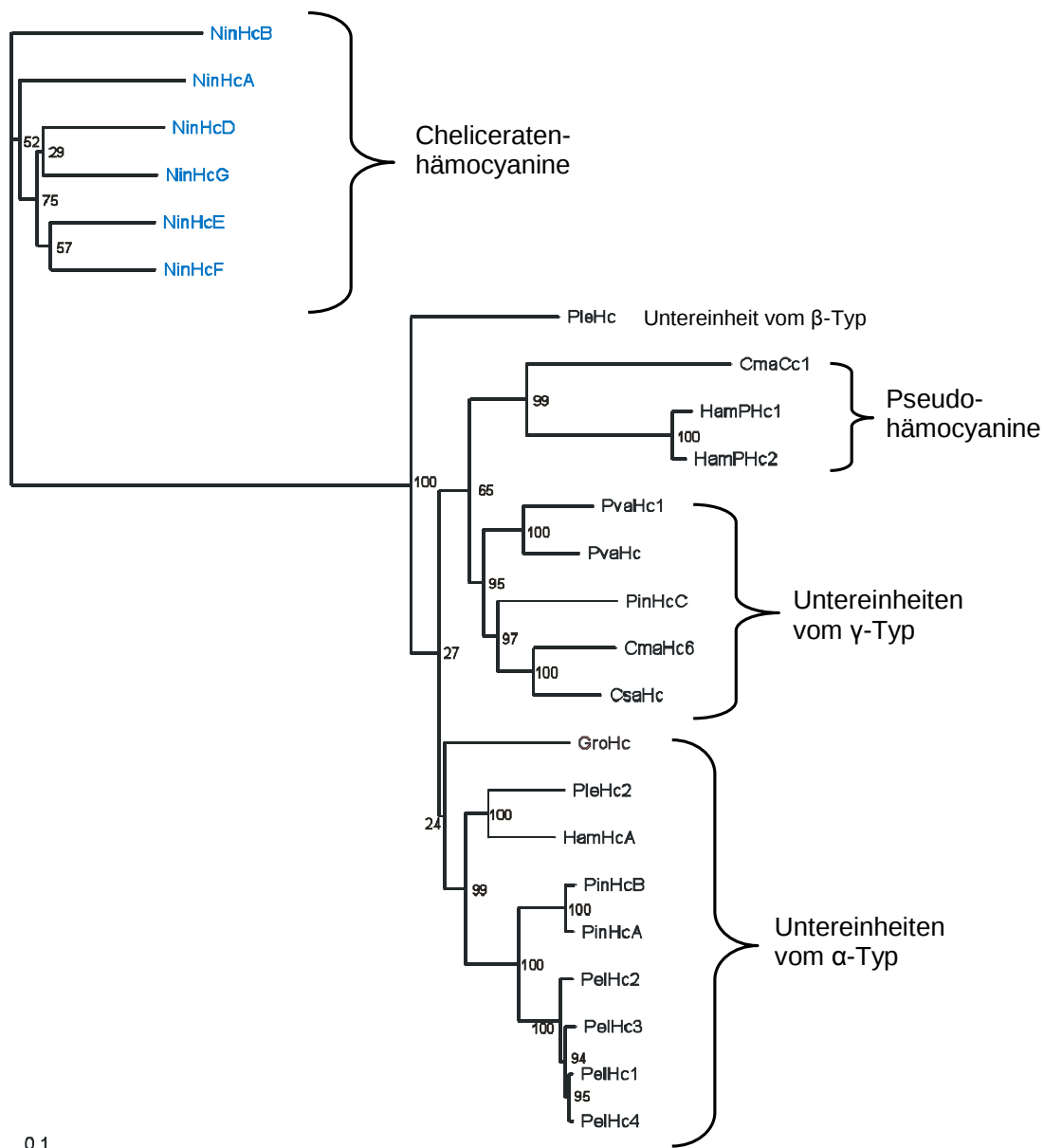
**Abb. 4.7:** Alignment der Aminosäuresequenz des Hämocyanins von *G. roeseli* mit der Hämocyaninuntereinheit HcA von *Palinurus interruptus*. Rot = 100 %ige Sequenzidentität; Grün = 50%ige Sequenzidentität. PinHcA: *Palinurus interruptus* Hämocyaninuntereinheit A; GroHc: *G. roeseli* Hämocyanin aus verschiedenen Sequenzen zusammengesetzt. Das Signalpeptid umfasst beim *G. roeseli* Hämocyanin 15 Aminosäuren und fehlt in der Sequenz des *P. interruptus* Hämocyanins.

### 4.3.2 Phylogenie der Crustaceenhämocyanine

Innerhalb der Malakostraca existieren drei verschiedene Untereinheitstypen, die immunologisch gegeneinander abzugrenzen sind (Markl, 1986). Diese werden als  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Typen bezeichnet. Während Untereinheiten vom  $\alpha$ -Typ in allen malakostraken Crustaceen gefunden wurden in denen Hämocyanin nachweisbar war, ist das Vorkommen von Untereinheiten des  $\beta$  und  $\gamma$ -Types nach bisherigem Kenntnisstand auf die dekapoden Krebse beschränkt. Hier kommen Arten mit drei Untereinheitstypen (z.B. *Homarus americanus*) ebenso vor, wie solche mit zwei oder nur einem Typ von Hämocyaninuntereinheiten (wie bei *Palinurus elephas*). Untereinheiten vom  $\alpha$ -Typ sind dabei immer vorhanden. Hingegen fehlt entweder der  $\beta$  (z.B. *Panulirus interruptus*) oder der  $\gamma$ -Typ (z.B. *Grapsus tenuicrustatus*; Markl, 1986). Die Hämocyanine der Brachyura sowie die der Astacura bestehen (bis auf wenige Ausnahmen (wie z.B. bei *P. elephas*) aus 2x6-meren. Hierzu sind, zusätzlich zu den  $\alpha$ -Untereinheitstypen, entweder solche des  $\beta$  und/oder  $\gamma$ -Types notwendig, bzw. wie es z.B. bei *Ocypode quadrata* der Fall ist, verschiedene Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheiten (Markl, 1986).

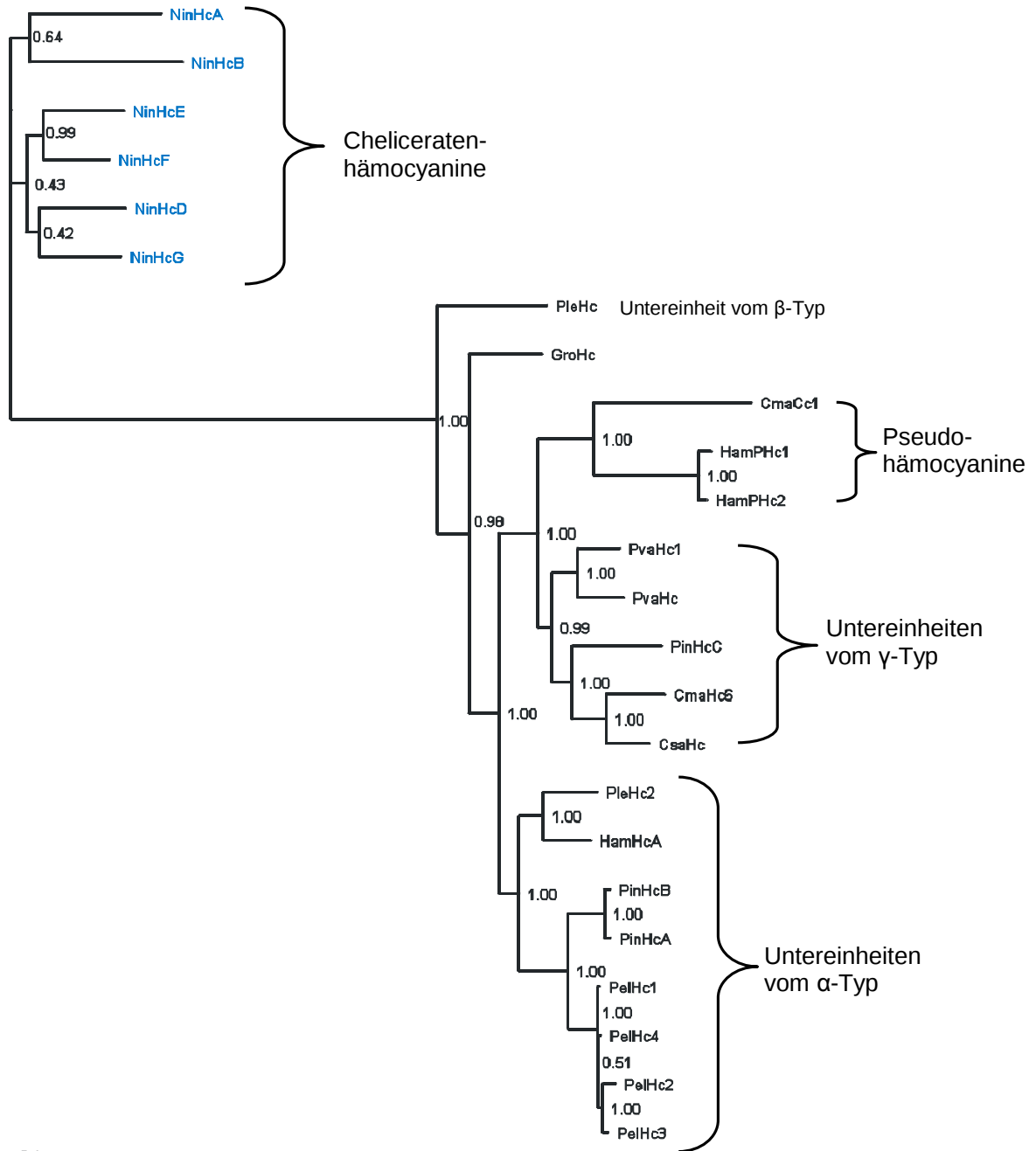
Beim Hämocyanin von *G. roeseli* handelt es sich, wie bei allen bisher bekannten Hämocyaninen von nichtdekapoden Krebsen, um ein Hexamer (z.B. Markl, 1986; Chan und Weeks, 1991). Die hier aufgeklärte Hämocyaninsequenz von *G. roeseli* wird in den phylogenetischen Untersuchungen in beiden Bäumen basal zu den übrigen Hämocyaninsequenzen des  $\alpha$ -Types der dekapoden Krebse gestellt. Die Einordnung ist nur insofern unterschiedlich, dass sich nach Neighbor-joining die Sequenz der Hämocyaninuntereinheit von *G. roeseli* basal zu den übrigen  $\alpha$ -Typ Untereinheiten anordnet (mit einem Bootstrapwert von 24 statistisch allerdings nicht gut abgesichert), wohingegen diese im Stammbaum nach der Bayes'schen Methode mit guter statistischer Unterstützung (0.98) direkt nach der Abspaltung der  $\beta$ -Typ Untereinheit abzweigt und somit auch basal zu den  $\gamma$ -Typ Untereinheiten und den Pseudohämocyaninen steht (0.98). In beiden Fällen ist die Hämocyaninunterheit von *G. roeseli* als ursprünglich anzusehen, was die phylogenetisch ältere Stellung der Amphipoden im Verhältnis zu den dekapoden Crustaceen widerspiegelt. Trotz dieser frühen Abspaltung fand in Untersuchungen eine Kreuzreaktion des Hämocyanins von *G. roeseli* mit Antikörpern gegen die Untereinheiten des  $\alpha$ -Types der dekapoden Crustaceen statt. Der Grund für diese Erkennung ist die langsame Evolutionsrate des Untereinheitstypes  $\alpha$ , der Untereinheitstyp  $\gamma$  hingegen verändert sich viel schneller (Kusche und Burmester, 2001). In beiden Bäumen spalten sich, wie bereits erwähnt, aus

einem gemeinsamen Vorläufer mit guter statistischer Unterstützung (Bootstrapwert 100, Bayes 1.00) zunächst die Sequenzen des  $\beta$ -Untereinheitstypes ab, was von vorhergehenden Untersuchungen bestätigt wird (Kusche, 2003). Dies bedeutet, dass sich die Untereinheiten vom  $\beta$ -Typ bereits vor der Trennung der Peracarida (Amphipoda und Isopoda) und der Eucarida (Euphausicea und Decapoda) von einem gemeinsamen Vorläuferhämocyanin abgespalten haben. Nach den hier durchgeführten phylogenetischen Analysen stehen in beiden Bäumen die Pseudohämocyanine den  $\gamma$ -Untereinheiten als Schwestergruppe gegenüber. Sowohl die Untereinheiten vom  $\gamma$ -Typ als auch die Pseudohämocyanine haben sich demnach aus einem gemeinsamen Vorläufer nach der Trennung von den  $\alpha$ -Typ Untereinheiten entwickelt. Diese Ergebnisse widersprechen denjenigen von Burmester und Terwilliger, in deren Untersuchungen die Pseudohämocyanine sich früher abspalten (Burmester, 1999; Terwilliger, 1999). Sie stimmen jedoch mit den Resultaten anderer Arbeiten überein, nach denen die Schwestergruppenstellung der Pseudohämocyanine zu den Hämocyaninuntereinheiten vom  $\gamma$ -Typ ebenfalls bestätigt wird (Kusche et al., 2003). Grund für die unterschiedliche Bewertung könnte die größere Anzahl an Sequenzen sein, die heute für phylogenetische Studien zur Verfügung steht. Die Pseudohämocyanine bilden einen gut abgesicherten, diskreten Ast (99/1.00). Die Auftrennung in Pseudohämocyanine und Untereinheiten des  $\gamma$ -Types erfolgte vor der Trennung der Brachyura (z.B. Cancer) und Astacura (z.B. Homarus).



**Abb. 4.8: Phylogenetische Position der Hämocyaninuntereinheit von *G. roeseli* innerhalb der Crustaceenhämocyanine.** Der Stammbaum wurde mit der Neighbor-joining Methode erstellt. Die Hämocyanine von *Nephila inaurata* (blau) bilden die Außengruppe.

NinHca-g: *Nephila inaurata* Hämocyanin Untereinheiten a-g; PleHc: *Pacifastacus leniculus* Hämocyanin-Untereinheit 1; CmaCC1: *Cancer magister* Cryptocyanin 1; HamPHc1,2: *Homarus americanus* Pseudohämocyanine 1, 2; PvaHc, Hc1: *Pennaeus vanamei* Hämocyanin, Hämocyanin - Untereinheit 1; PinHcA-C: *Palinurus intererruptus* Hämocyanin-Untereinheiten A-C; CmaHc6: *Cancer magister* Hämocyanin-Untereinheit 6; CsaHc: *Callinectes sapidus* Hämocyanin; GroHc: *G. roeseli* Hämocyanin; PleHc2: *Pacifastacus leniculus* Hämocyanin-Untereinheit 2; HamHcA: *Homarus americanus* Hämocyanin-Untereinheit A; PelHc1-4: *Palinurus elephas* Hämocyanin-Untereinheiten 1-4.



0.1

**Abb. 4.9: Phylogenetische Position der Hämocyaninuntereinheit von *G. roeseli* innerhalb der Crustaceenhämocyanine.** Der Stammbaum wurde mit der Bayes'schen Methode erstellt. Die Hämocyanine von *Nephila inaurata* (blau) bilden die Außengruppe. Legende siehe vorherigen Stammbaum.

#### 4.4 Hämocyanine und Hexamerine der Insekten

Wie die Myriapoden besitzen auch die Insekten ein gut entwickeltes Tracheensystem. Daher ging man bislang davon aus, dass in dieser Arthropodengruppe ein respiratorisches Protein verloren gegangen ist. Einige Insekten, die ein solches als spezielle Anpassungen an hypoxische Lebensräume benötigen, besitzen Hämoglobin (z.B. Weber und Vinogradov, 2001). Lediglich im Embryo des Grashüpfers *Schistocerca americana* wurde ein Protein (EHP = Embryonales Hämolymp-Prottein) identifiziert (Sanchez et al., 1998), das alle Merkmale eines Hämocyanins, einschließlich der sechs Histidine der Kupferbindungsstellen aufwies. Es konnte allerdings in späteren Entwicklungsstadien nicht mehr nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden keine weiteren funktionellen Untersuchungen durchgeführt, so dass die Rolle des EHP als respiratorisches Protein nicht geklärt ist.

Hexamerine wurden bei allen bisher untersuchten Insekten gefunden (Telfer und Kunkel, 1991; Burmester, 1999). Allerdings stammen alle Sequenzdaten, die verfügbar sind, von Hexamerinen in höheren Insekten, wie z.B. den Dipteren oder Lepidopteren (Burmester, 1999). Da es sich beim Ofenfisch, *T. domestica*, ebenso wie bei der Steinfliege *P. marginata* um ein basales Insekt handelt, bot sich hier die Möglichkeit zusätzlich zur Evolution der Hämocyaninuntereinheiten noch diejenige der Hexamerine zu untersuchen.

##### 4.4.1 Die Hämocyanine und Hexamerine von *Perla marginata* und *Thermobia domestica*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, zwei vollständige Hämocyaninuntereinheiten der Steinfliege *P. marginata* zu sequenzieren. Die cDNA-Sequenzen des Hämocyanins von *P. marginata* (Hc1 und Hc2) sind zu 48,3% identisch. Beide besitzen alle sechs Histidine, welche die Kupferbindungsstellen bilden, sowie die drei Phenylalanine in den Domänen 1 und 2, die in den meisten Hämocyaninen eine Rolle bei der Stabilisierung der Sauerstoffbindung spielen. Beide zeigen die höchste Übereinstimmung mit dem EHP von *S. americana* (65,3 bzw. 47,3% Identität).

Das Hämocyanin bei *P. marginata* ist, wie der Western-Blot (Abb. 3.14) zeigt, in allen Entwicklungsstadien (Larvenstadium 1-3 Jahre, adulte Tiere) in einer sehr hohen Konzentration von bis zu 25% aller Hämolympheproteine zu finden. Es handelt sich bei dem

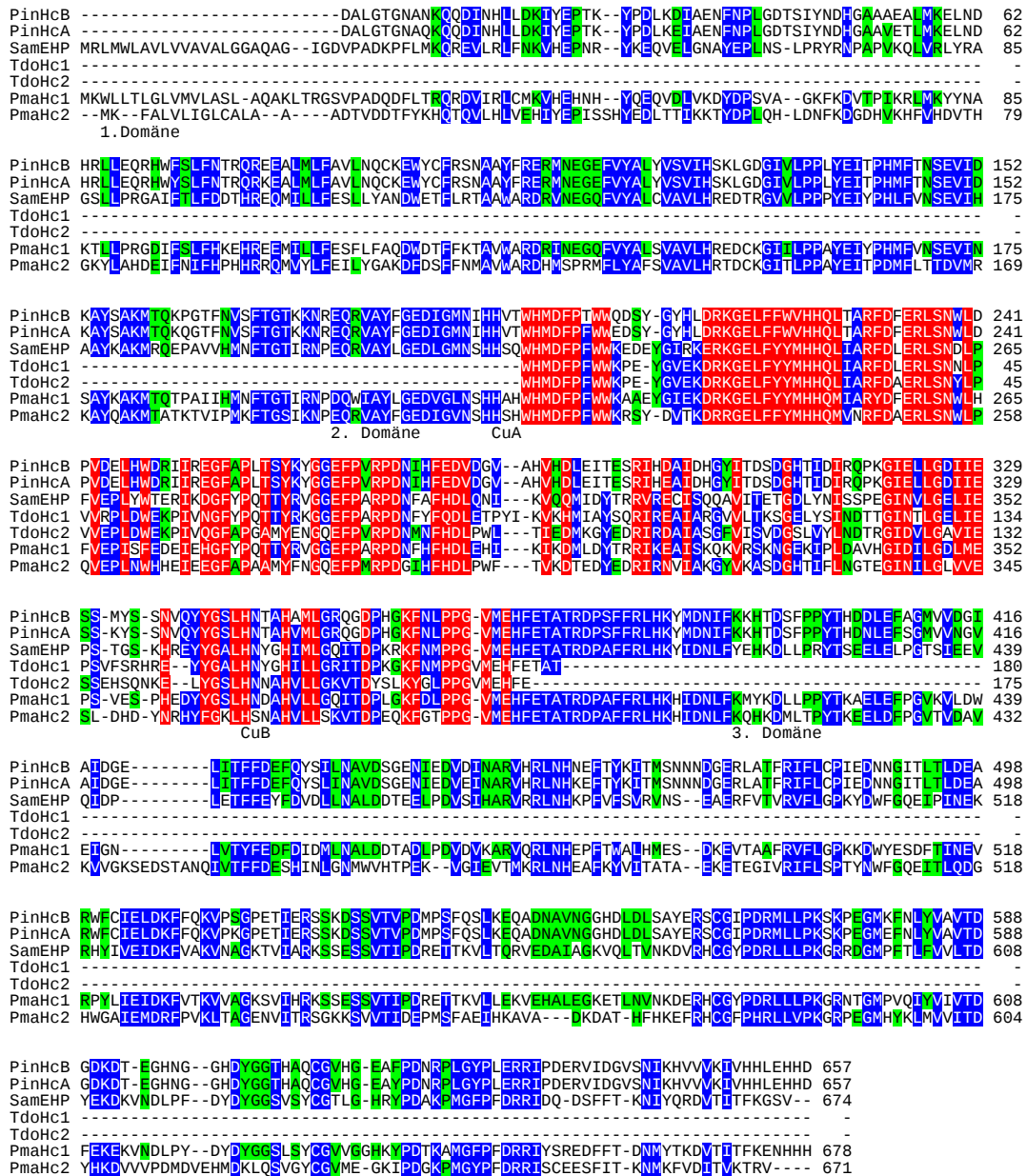
Steinfliegenhäemocyanin um ein 1x6 meres Protein, wie es auch bei vielen nichtdekapoden Malakostraken vorkommt. Da in der Hämolymphe auch große Mengen an Hexamerinen (die ebenfalls Hexamere bilden) gefunden wurden, war es nicht möglich, die Häemocyanine mittels Elektronenmikroskopie näher zu charakterisieren. Über die Erstellung einer Sauerstoffbindungskurve (in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Biophysik der Universität Mainz) aus der Hämolymphe konnte der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei dem Hämocyanin von *P. marginata* um ein funktionelles respiratorisches Protein handelt, welches in der Lage ist, Sauerstoff reversibel zu binden (Abb. 3.15 und 3.16). Der  $P_{50}$  ist mit  $\approx 8$  Torr vergleichsweise niedrig, die Affinität zu Sauerstoff entsprechend hoch. Das Hämocyanin zeigt mit einem Hill-Koeffizient von  $h \approx 2$  außerdem deutliche Kooperativität. Die Sauerstoffkonstanten der T (nichtoxigenierten) und R (oxigenierten) Stadien des Hämocyanins wurden mit 16, bzw. 1,6 Torr bestimmt. Diese kinetischen Werte stimmen mit der vorausgesagten hexameren Struktur überein. Wird die Hämolymphe eingefroren, dissoziiert das Hämocyanin in zwei Untereinheiten mit unterschiedlichen Sauerstoffaffinitäten ( $P_{50}$ ) von 0,063 und 0,023 Torr. Dieser große Unterschied in der Affinität korreliert mit den strukturellen Unterschieden der zwei Hämocyaninuntereinheiten, die wie bereits erwähnt, auch in ihrer Sequenz nur Identitäten von 48,3% zeigen.

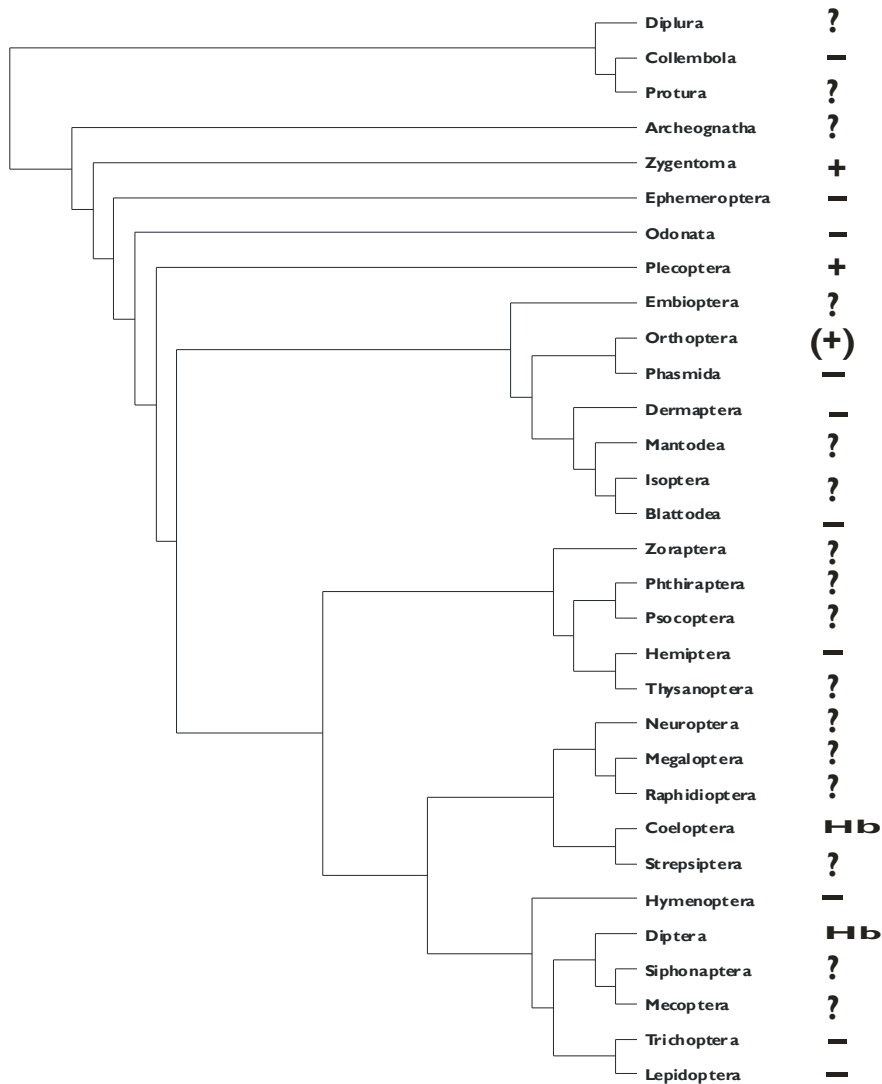
Die oben beschriebene Kombination aus hoher Sauerstoffaffinität und Kooperativität stellt für den Lebensraum, in dem *P. marginata* lebt, eine sinnvolle Anpassung dar. Diese Steinfliegenart lebt während ihrer Larvenentwicklung in Bächen mit schneller Strömung und kühlem, sauerstoffreichem Wasser (Indikatororganismus für biologische Gewässergüte 1). Trotz der relativ guten Sauerstofflöslichkeit in solchen Gewässern ist der Sauerstoffgehalt des Wassers im Verhältnis zur Luft um ein Vielfaches geringer. Daher benötigt die Steinfliege ein Hämocyanin, das in der Lage ist, Sauerstoff mit hoher Effektivität dem Wasser zu entziehen. Darüber hinaus benötigt sie viel Energie, um sich in der Strömung festhalten, bzw. sich gegen die Strömung bewegen zu können. Das bedeutet, eine schnelle Sauerstofffreisetzung muss ebenfalls möglich sein.

Beim Ofenfisch (*T. domestica*), einem Vertreter der Zygentoma (Thysanura), gelang es ebenfalls zwei unterschiedliche Hämocyaninuntereinheiten partiell zu sequenzieren. Bei den Versuchstieren handelte es sich meistens um Tiere im letzten Larvenstadium, bzw. adulte Tiere. Die Sequenzen beinhalten jeweils nur fünf der sechs Histidine der Kupferbindungsstellen, da die Primer für die RT-PCR in diesen stark konservierten Bereich gelegt wurden und die direkte Primerbindungsstelle und somit das sechste Histidin fehlt. Es handelt sich bei beiden Untereinheiten aber eindeutig um Häemocyanine (Abb. 4.10). In

allen anderen Insekten, die mittels eines spezifischen Antikörpers gegen das Hämocyanin der Steinfliege *P. marginata* und/oder mittels RT-PCR mit degenerierten Primern untersucht wurden (Tabelle 3.1, Abb. 4.11), konnten hingegen bisher keine Hämocyanine gefunden werden. Für einige Insektenarten (z.B. *Drosophila melanogaster*) existieren Genomprojekte (Berkeley Drosophila Genome Project), in deren Rahmen bislang kein Hämocyanin nachgewiesen wurde. Andere Insektenordnungen sind noch zu untersuchen. Es kann folglich vermutet werden, dass das Hämocyanin während der Evolution der höheren Insekten verloren ging. Dort, wo ein respiratorisches Protein benötigt wurde, entwickelte sich Hämoglobin (Weber und Vinogradov, 2001).

Wie in den Untersuchungen aufgezeigt werden konnte, kommen Hexamerine und Hämocyanine, zumindest bei den beiden hier beschriebenen Insekten parallel vor. Bei *P. marginata* und *T. domestica* könnte es sich daher um sogenannte „Übergangsarten“ handeln, die das Hämocyanin als respiratorisches Protein noch nicht verloren haben, bei denen jedoch bereits die Evolution eines Hexamerins aus der Hämocyaninuntereinheit 1 stattgefunden hat. Die Steinfliege *P. marginata* verfügt in allen Lebensstadien über einen hohen Hexamerin Gehalt in der Hämolymphe, der mit den Jahren zunimmt (Abb. 3.14) und bei adulten Tieren am höchsten ist. Eine Begründung hierfür könnte die Tatsache sein, dass die Vertreter der Art *P. marginata* nach Beendigung des Larvenstadiums mit dem Schlupf als adulte Tiere nur noch über verkümmerte Mundwerkzeuge verfügen und somit keine feste Nahrung zu sich nehmen können. Während der Zeit der Paarung und der Eiablage leben die Steinfliegen von ihren Reserven, die in Form von Hexamerinen gespeichert wurden (Engelhardt, 1996).





**Abb 4.11: Übersicht über die bereits auf Hämocyanin untersuchten Insektenspezies.** Der Schwerpunkt der im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Untersuchungen lag auf den basalen Insekten. In den meisten Insektenordnungen konnte kein Exemplar mit Hämocyanin als respiratorischem Blutfarbstoff gefunden werden. Bei Vertretern der Lepidoptera und Diptera konnten im Rahmen eines Genomprojektes keine Hinweise auf ein Vorkommen von Hämocyanin gefunden werden. Bei einem Vertreter der Orthoptera (*S. americana*) konnte ein EHP in der embryonalen Hämolymphe nachgewiesen werden. Bei den mit Hb bezeichneten Ordnungen wurde in einigen Arten ein Hämoglobin nachgewiesen.

#### 4.4.2 Phylogenie der Hämocyanine und Hexamerine von Insekten

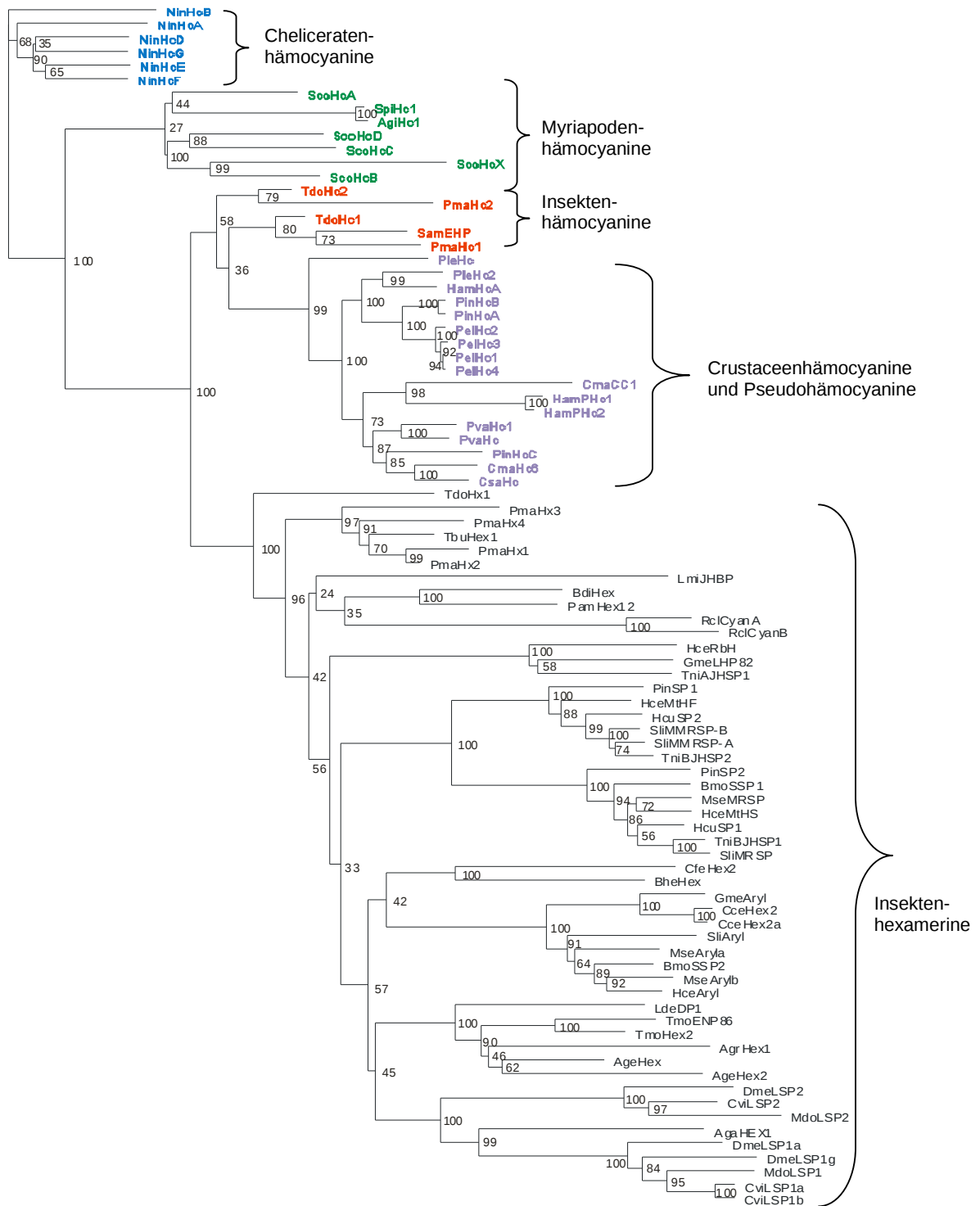
Die Sequenzen der Hämocyaninuntereinheiten von *P. marginata* und *T. domestica* wurden herangezogen, um phylogenetische Analysen mit Bayes sowie Neighbor-joining durchzuführen. Im Fall der Insektenhämocyanine unterscheiden sich die beiden Stammbäume wesentlich. Aus Gründen, die bereits unter 4.2.2 erläutert wurden, findet auch hier der mittels Bayes'scher Analyse erstellte Stammbaum Anwendung. In diesem werden die Insektenhämocyanine in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste besteht aus den Hämocyaninuntereinheiten 2 von *P. marginata* und *T. domestica*. Diese stehen in einem gemeinsamen Ast basal zu den Hämocyaninen der Crustaceen und den anderen Insektenproteinen. Die Untereinheiten 1 der Insektenhämocyanine stehen hier als diskreter Ast basal zu den Hexamerinen. Daraus resultieren zwei Schlussfolgerungen:

1. Die Insektenhämocyanine sind paraphyletisch, d.h. sie ordnen sich an unterschiedlichen Ästen an. Die Hämocyaninuntereinheit 2 stammt von einem ursprünglicheren Vorläufer ab, der in den Crustaceen verloren ging.
2. Das Hexamerin der Insekten evolvierte ausschließlich aus der Hämocyaninuntereinheit 1 nach der Auftrennung von Crustaceen und Hexapoden.

Das Hexamerin von *T. domestica* steht in beiden Bäumen mit guter statistischer Unterstützung (100/1.00) basal zu den übrigen Insektenhexamerinen, dies geht auch mit der Systematik der Insekten konform. Die Zygentoma gehören als primär flügellose (apterygote) Insekten zu den Thysanura. Diese weisen sehr primitive Merkmale auf und werden daher als basal eingestuft. Die Hexamerine der untersuchten Steinfliegen bilden einen diskreten Ast und stehen ebenfalls an der Basis zu den übrigen Hexamerinen. Dies wird auch durch die systematische Einordnung gestützt. Es handelt sich bei *P. marginata* zwar um einen Vertreter der Pterygota (geflügelte Insekten), viele Merkmale, wie z.B. die Art der Flügelfaltung, sind allerdings als ursprünglich anzusehen. Da beim Ofenfisch lediglich eine Hexamerinuntereinheit gefunden werden konnte, bei den Steinfliegen aber mehrere verschiedene, ist davon auszugehen, dass die Diversifizierung der Untereinheiten erst in den pterygoten Insekten erfolgte.

Sowohl im Stammbaum nach Neighbor-joining als auch nach Bayes zeigen die Insektenhämocyanine eine nahe Verwandtschaft zu den Crustaceenhämocyaninen. Dies unterstützt die Pancrustacea-Hypothese, die eine solche Verwandtschaft von Crustaceen und Insekten postuliert (z.B. Regier und Shultz, 1992; Boore et al., 1995; Hwang et al., 2001). Ob sich die Insektenhämocyanine aus denen der malakostraken Crustaceen entwickelt haben, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Allerdings sind die Hämocyanine

der Steinfliege und des Ofenfisches Hexamere, was bedeuten könnte, dass sich die Insekten bereits vor dem Entstehen der Decapoda von einem Vorläufer abspalteten, der über Hämocyanin verfügte. Einige basale Insekten besitzen kein Hämocyanin (z.B. Collembola, Ephemeroptera, Odonata). Bei diesen ist das respiratorische Protein wahrscheinlich bereits verloren gegangen. Die Stellung der Insektenhämocyanine im Stammbaum weist darauf hin, dass ein Taxon der Tracheata mit einem Schwestergruppenverhältnis der Hexapoden und Myriapoden unwahrscheinlich ist (z.B. Snodgrass, 1938; Wheeler, 1993, 2001). Die Stammbäume unterstützen hingegen die Einteilung der Arthropoden gemäß der Pancrustacea-Hypothese, die eine nahe Verwandtschaft der Crustaceen und Insekten unter Ausschluss der Myriapoden postuliert (z.B. Regier und Shultz, 1992; Boore et al., 1995; Hwang et al., 2001). Neben molekularbiologischen Untersuchungen, die auf ein solches Taxon der Pancrustaceen hinweisen (z.B. Giribet et al., 2001; Burmester, 2001), liegen auch morphologische Arbeiten vor, die Zweifel an der Tracheata-Hypothese aufkommen lassen (z.B. Paulus, 1979, 2001; Dohle, 1997). Unklarheiten bestehen beispielsweise in der Frage einer homologen Entstehung der Tracheen von Myriapoden und Insekten. Diese sind bereits innerhalb der Myriapodengruppen so heterogen, dass eine konvergente Entstehung nicht ausgeschlossen werden kann (Klok et al., 2002). Die Tracheen der Insekten weichen vom Myriapodenbauplan ebenfalls deutlich ab, so dass auch hier eine Homologie nicht als gesichert gelten kann (z.B. Hilken, 1998). Weitere Fragen werfen die Neuroblastenentwicklung (Dohle, 1997), sowie die Struktur der Ommatidien von Myriapoden und Insekten (Paulus 1979, 2001) auf, die sich wesentlich voneinander unterscheiden.



0.1

Legende siehe nächste Seite

**Abb. 4.12: Phylogenetische Position der Insektenhäemocyanine und Hexamerine innerhalb der Häemocyanin-Superfamilie.** Der Stammbaum wurde mit der Neighbor-joining Methode erstellt. Die Häemocyanine von *Nephila inaurata* (blau) bilden die Außengruppe.

NinHcA-G: *Nephila inaurata* Häemocyanin Untereinheiten A-G; ScoHcA-D, X: *Scutigera coleotrata* Häemocyanin- Untereinheiten A-D, X; SpiHc1: *Spirostreptus spec.* Häemocyanin-Untereinheit 1; AgiHc1: *A. gigas* Häemocyanin-Untereinheit 1; TdoHc1,2: *T. domestica* Häemocyanin-Untereinheiten 1 und 2; PmaHc1, 2: *P. marginata* Häemocyanin-Untereinheiten 1,2; SamEHP: *Schistocerca americana* Embryonic Hemolymph Protein; PleHc, Hc2: *Pacifastacus leniculus* Häemocyanin-Untereinheit 1, 2; Pel Hc1-4: *Palinurus elephas* Häemocyanin-Untereinheiten 1-4; HamHcA: *Homarus americanus* Häemocyanin-Untereinheit A; PinHcA-C: *Panulirus interruptus* Häemocyanin-Untereinheiten A-C; CmaCC1: *Cancer magister* Cryptocyanin 1; HamPHc1,2: *Homarus americanus* Pseudohäemocyanine 1,2; PvaHc, Hc1: *Pennaeus vanamei* Häemocyanin, Häemocyanin -Untereinheit 1; CmaHc6: *Cancer magister* Häemocyanin-Untereinheit 6; TdoHex1: *T. domestica* Hexamerin 1; Pma Hex1-4: *P. marginata* Hexamerin-Untereinheiten 1-4; Tbu Hex1: *Taeniopteryx burksi* Hexamerin 1; Lmi JHBP: *Locusta migratoria* juveniles Hormon bindendes Protein; BdiHex: *Blaberus discoidalis* Hexamerin; Pam Hex12: *Periplaneta americana* Hexamerin 12; RclCyanA, B: *Riptortus clavatus* Cyanoprotein  $\alpha$ ,  $\beta$ ; HceRba: *Hyalophora cecropia* Riboflavin-bindendes Hexamerin; HceMthF: *Hyalophora cecropia* moderat methioninreiches Hexamerin; HceMthS: *Hyalophora cecropia* sehr methioninreiches Hexamerin; GmeLHP82: *Galleria mellonella* larvales Hämolymph Protein 82; TniAJHSP1,2: *Trichoplusia ni* saures Juvenilhormon supprimierendes Protein; TniBJHSP1: *Trichoplusia ni* basisches Juvenilhormon supprimierendes Protein; HcuSP1,2: *Hyphantria cunea* Speicherprotein 1,2; PinSP1: *Podia interpunctella* Serumprotein 1; SliMMRSP-A,B: *Spodoptera litura* moderat methioninreiches Hexamerin; BmoSSP1,2: *Bombyx mori* geschlechtsspezifisches Speicherprotein 1, 2; Mse MRSP: *Manduca sexta* methioninreiches Speicherprotein; CfeHex2: *Camponotus festinatus* Hexamerin 2; Gme Arylphorin: *Galleria mellonella* Arylphorin; BheHex: *Bracon hebetor* Hexamerin; Cce Hex2, 2a: *Corcyra cephalonica* Hexamerin 2, 2a; ; SliAryl: *Spodoptera litura* Arylphorin; MseAryla,b; *Manduca sexta* Arylphorin a,b; HceAryl: *Hyalophora cecropia* Arylphorin; LdeDP1: *Leptinotarsa decemlineata* Diapause Protein 1; TmoENP86: *Tenebrio molitor* frühes Verpuppungshormon; TmoHex2: *Tenebrio molitor* Hexamerin 2; Agrhex1: *Anthonomus grandis* Hexamerin1 ; AgeHex, Hex2: *Apriona germani* Hexamerin, Hexamerin 2; DmeLSP1a, g, LSP2 : *Drosophila melanogaster* larvale Serumproteine 1 a, g, 2; CviLSP1a,b,LSP2: *Calliphora vicina* larvale Serumproteine 1a, g, 2; MdoLSP1, 2: *Musca domestica* larvale Serumproteine 1, 2; AgaHex1: *Anopheles gambiae* Hexamerin1.

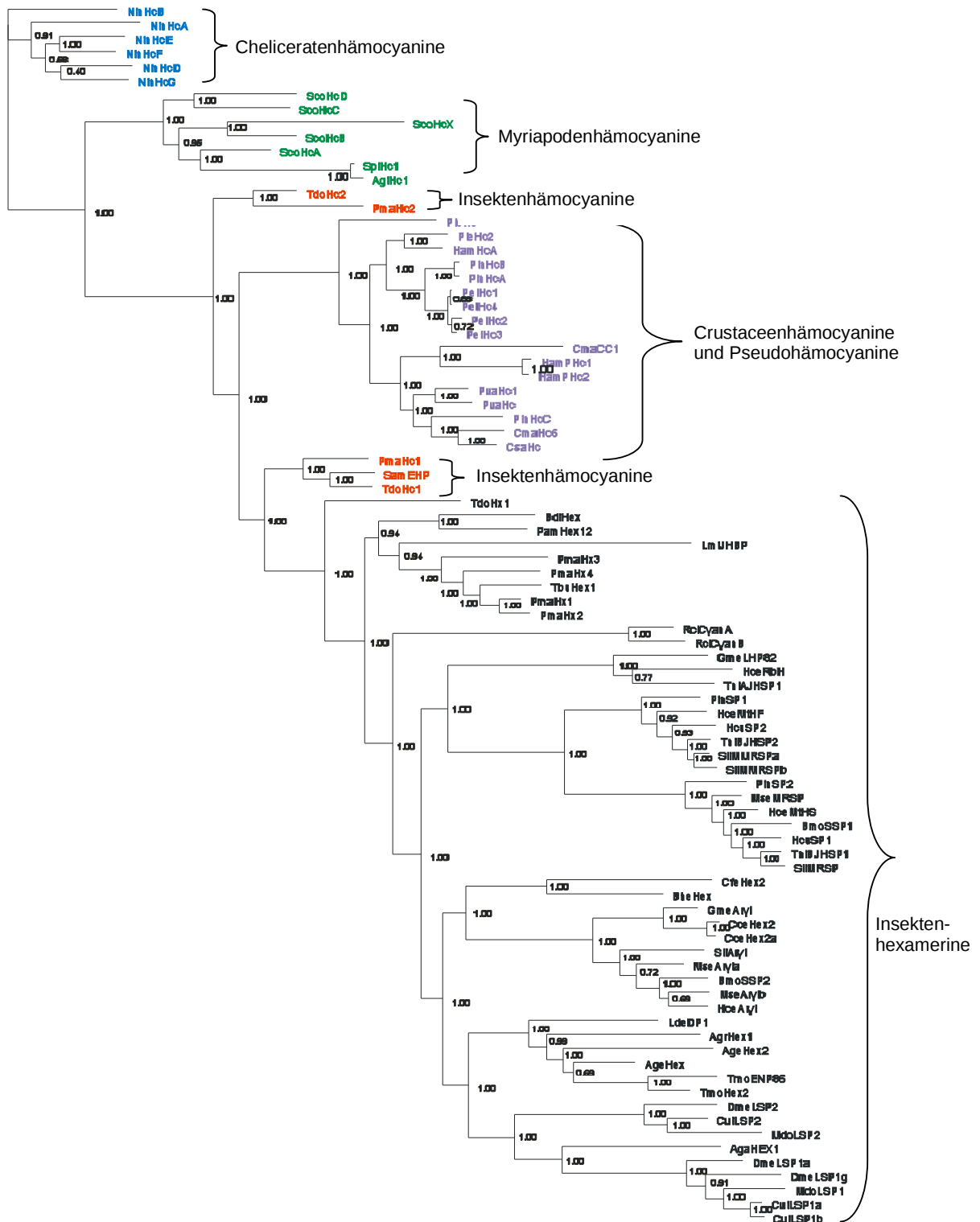


Abb 4.13: Phylogenetische Position der Insektenhäemocyanine und Hexamerine innerhalb der Häemocyanin-Superfamilie. Der Stammbaum wurde nach der Bayes'schen Methode erstellt. Legende siehe vorherigen Stammbaum.

## 4.5 Phenoloxidasen

Die Phenoloxidasen der Arthropoden bilden Hexamere (Jaenicke und Decker, 2003) und besitzen, wie die Hämocyanine, ebenfalls zwei Kupferionen im aktiven Zentrum, die von sechs Histidinen gebunden sind (Burmester, 2002). Sie wurden bislang in allen Arthropodengruppen mit Ausnahme der Cheliceraten und der Onychophoren gefunden (Nagai und Kawabata, 2000; Decker et al., 2001). Bei den Cheliceraten übernimmt das Hämocyanin augenscheinlich die Funktion der Phenoloxidase (Nagai und Kawabata, 2000; Burmester, 2002). Bei den Onychophoren war die Existenz einer Phenoloxidase bislang unklar. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, eine Phenoloxidase in *Epiperatus spec.* nachzuweisen.

### 4.5.1 Die Phenoloxidase von *Epiperatus spec.*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, die cDNA-Sequenz der Phenoloxidase von *E. spec.* teilweise aufzuklären. Sie ist vollständig genug, um den Nachweis zu erbringen, dass es sich um eine echte Phenoloxidase und nicht um ein Hämocyanin handelt. In der am 5'-Ende unvollständigen Sequenz sind vier der sechs Histidine der Sauerstoffbindungsstellen CuA (ein Histidin) und CuB (drei Histidine) vorhanden. Es handelt sich also eindeutig um ein respiratorisches Protein, das aber im Sequenzvergleich eindeutig größere Ähnlichkeit mit Phenoloxidasen anderer Vertreter der Arthropoden aufweist, als mit dem bereits identifizierten Hämocyanin von *E. spec.* (Kusche et al., 2002).

Mit der Identifikation einer Phenoloxidase bei einem Onychophoren ist diese, außer bei den Cheliceraten, in allen Arthropodengruppen nachgewiesen. Die Sequenz der cDNA konnte nicht komplett aufgeklärt werden, da in der bereits vorhandenen cDNA-Bank kein am 5'-Ende vollständiger Klon vorhanden war. Weil es sich bei Onychophoren um seltene Tiere handelt, war es auch nicht möglich, innerhalb der vorliegenden Arbeit neue Versuchstiere zu bekommen und diese zu bearbeiten.

Der Nachweis, dass bereits bei den als basale Arthropoden einzustufenden Onychophoren (Westheide/Rieger, 2003) eine Phenoloxidase vorkommt, konnte somit erbracht werden. Das beweist, dass im gemeinsamen Vorfahren aller Arthropoden sowohl eine Phenoloxidase, als auch ein Hämocyanin existiert haben muss.

## 4.6 Evolution der Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoden

Allen Mitgliedern der Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoden ist eine hochkonservierte Grundstruktur gemeinsam (Burmester, 1997). Es wird vermutet, dass die Hämocyanine aller Arthropoden sich aus einem gemeinsamen Vorläufer, einer sauerstoffumsetzenden Phenoloxidase entwickelt haben (z.B. Burmester, 2001). Diese war bereits, wie eigene Untersuchungen belegen, bei den Onychophoren vorhanden die, wie bereits erwähnt, darüber hinaus auch über ein Hämocyanin verfügen (Kusche et al., 2002). Das bedeutet, die Trennung in Phenoloxidasen und Hämocyanine erfolgte vor der Aufspaltung der Onychophoren und der übrigen Arthropoden und macht eine Monophylie dieses Taxons wahrscheinlich. Die Evolution der Hämocyanine ging vermutlich von Hexameren aus, bevor sich diese zu höheren Aggregaten zusammenlagerten und so eine Verbesserung der Sauerstoffaufnahme- und abgabe durch verstärkte Kooperativität ermöglichten (Markl, 1986; Burmester, 2003). Wie hier gezeigt wurde, erfolgte dieser Vorgang bei den einzelnen Arthropodengruppen mehrfach.

Aus den Hämocyaninen entwickelten sich dann die Pseudohämocyanine der Crustaceen und die Hexamerine der Insekten unabhängig voneinander (Burmester et al., 1998; Burmester, 1999). Dies geschah, indem es im Verlauf der Evolution zum Verlust der Sauerstoffbindungseigenschaften kam, und die Proteine nun vor allem der Speicherung dienten (Burmester, 2002). Einige basale Insektenarten verfügen sowohl über Hämocyanine als auch Hexamerine. Hierbei dürfte es sich um „Übergangsarten“ handeln, bei denen Hämocyanine noch vorhanden sind, Hexamerine sich aber bereits entwickelt haben. Bei höheren Insekten konnte kein Hämocyanin mehr gefunden werden, es ist im Laufe der Evolution verloren gegangen.

## 4.7 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Sequenzen aus allen Gruppen der Arthropoden erarbeitet. Obwohl hierdurch ein weiterer Schritt in der Aufklärung der Evolution der Hämocyaninsuperfamilie und der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Arthropoden getan wurde, sind viele Fragen noch immer zu klären. So wäre es z.B. interessant, innerhalb der Myriapoden die Gruppe der Symphylen und Pauropoden zu untersuchen. In der Klasse der Crustaceen wären die entomostraken Taxa bezüglich des Vorhandenseins von Hämocyanin von großem Interesse. Obwohl die Tracheata-Hypothese nach derzeitigem

Wissensstand als überholt angesehen werden kann, sind auch in diesem Zusammenhang noch viele Fragen zu beantworten, wie zum Beispiel die umstrittene Monophylie der Crustaceen. Auch die genaue Position der Myriapoden im Arthropodenstammbaum ist noch immer nicht sicher geklärt. So werfen neue Ergebnisse immer wieder neue Fragen auf, was die weitere Entwicklung der Arthropodensystematik auch zukünftig interessant machen wird.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden cDNA-Banken eines Diplopoden (*Archispirostreptus gigas*), zweier Insektenarten (*Thermobia domestica*, *Perla marginata*) und eines Cheliceraten (*Limulus polyphemus*) erstellt. Eine cDNA-Bank des Chilopoden *Scutigera coleoptrata*, sowie des Onychophoren *Epiperatus spec.* war bereits vorhanden. Diese Expressionsbanken wurden mittels Antikörper- bzw. Sondenscreenings auf Hämocyanin- bzw. bei den Insekten auch auf Hexamerinklone durchmustert.

- Bei *A. gigas* konnte eine komplette Hämocyaninunterheit gefunden werden. Eine zweite Untereinheit, die im Western-Blot zu sehen war, konnte nicht identifiziert werden.
- Bei *S. coleoptrata* gelang es, die letzte noch fehlende Untereinheit (HcB) vollständig zu sequenzieren, sodass eine abschließende Charakterisierung des Hämocyanins möglich war.
- Bei der Steinfliege *P. marginata* wurden zwei Hämocyaninuntereinheiten gefunden und vollständig sequenziert, darüber hinaus konnte über Erstellung einer Sauerstoffbindungskurve (in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biophysik, Arbeitsgruppe Prof. Decker) der Nachweis erbracht werden, dass es sich um ein funktionelles respiratorisches Protein handelt. Ebenfalls bei der Steinfliege wurden die Sequenzen eines kompletten Hexamerins sowie drei Hexamerinteilsequenzen erarbeitet.
- Beim Ofenfisch *T. domestica* konnten zwei Hämocyaninuntereinheiten teilweise, sowie ein Hexamerin vollständig sequenziert werden.
- Beim xiphosuren Cheliceraten *L. polyphemus* konnte die Untereinheit II des Hämocyanins komplett sequenziert werden, drei weitere Untereinheiten liegen als Teilsequenzen vor.
- Beim Onychophoren *E. spec.* wurde im Rahmen eines EST-Projektes in Kooperation mit dem MPI für molekulare Genetik in Berlin, eine Prophenoloxidase gefunden, deren Sequenz teilweise aufgeklärt werden konnte.

Die erarbeiteten Sequenzen wurden im Anschluss für phylogenetische Studien benutzt. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die sogenannte „Tracheata-Hypothese“ immer unwahrscheinlicher wird. Diese geht von einer Schwestergruppenstellung der Hexapoda und der Myriapoda aus. Die hier gemachten Untersuchungen widersprechen dieser Hypothese eindeutig. Die Ergebnisse stützen vielmehr die „Pancrustacea-Hypothese“. In den

Stammbäumen sind die Crustaceenhämocyanine eindeutig in naher Verwandtschaft zu den paraphyletisch entstandenen Insektenhämocyaninen angeordnet. Ob die Crustaceen monophyletischen Ursprungs sind, kann nicht eindeutig beurteilt werden, es bestehen aber weiterhin begründete Zweifel. Die Myriapodenhämocyanine stehen in Schwestergruppenstellung zu den Crustaceen und den Insektenhämocyaninen. Dies weist auf ein gemeinsames Taxon der Mandibulata hin. Die systematische Stellung der Myriapoden innerhalb der Arthropoden kann allerdings nicht abschließend geklärt werden. Dazu ist eine weitergehende Aufklärung von Hämocyaninsequenzen in diesem Arthropodentaxon notwendig.

## 6. Literatur

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F., et al. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287, 2185-2195

Aguinaldo, A.M.A., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A. & Lake, J. A. (1997): Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulding animals. Nature Vol. 387, 489-493

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

Averdam A., Markl J., Burmester T. (2003). Subunit sequences of the 4 x 6- mer hemocyanin from the golden orb-web spider, *Nephila inaurata*. Eur. J. Biochem. 270, 3432-9

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

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

Ballweber P., Markl J., Burmester T. (2002). Complete hemocyanin subunit sequences of the hunting spider *Cupiennius salei*: recent hemocyanin remodeling in entelegyne spiders. J. Biol. Chem. 277, 14451-7

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

- Berthet J., Berthet P. and Wibo M. (1965). Caracteristiques des hemocyanines d'Isopodes. Arch. Int. Physiol. Biochem. 72, 676-677
- Bijholt M. M.C., van Heel M.C. and van Bruggen E.F. (1982). Comparison of 4x6-mer hemocyanins from three different arthropods using computer alignment and correspondence analysis. J. Mol. Biol. 161, 139-153
- Boisset N., Taveau J.C., and Lamy J.N. (1990) An approach to the architecture of *Scutigera coleoptrata* hemocyanin by electron microscopy and image processing. Biol. Cell. 86, 73-84
- Boore J.L., Lavrov D.V., and Brown W.M. (1998). Gene translocation links insects and crustaceans. Nature 392,667-668
- Börner C. (1909). Neue Homologien zwischen Crustaceen und Hexapoden. Zool. Anz. 34, 100-124
- Briggs D.E.G., Weedon M.J., and White M.A. (1993). Arthropoda (Crustacea excluding Ostracoda). The fossil record 2, 321-342. Chapman and Hall, London.
- Braun R.P., Wyatt G.R. (1996). Sequence of the Hexameric Juvenile Hormone-binding Protein from the Hemolymph of *Locusta migratoria*. J. Biol. Chem. 271, 31756-62.
- Brusca and Brusca ( 1990). Invertebrates. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA
- Burmester T., Massey H.C. Jr., Zakharkin S.O., Benes H. (1998). The evolution of hexamerins and the phylogeny of insects. J. Mol. Evol. 47, 93-108
- Burmester T., Scheller K. (1992). Identification of binding proteins involved in the stage-specific uptake of arylphorin by the fat body cells of *Calliphora vicina*. Insect Biochem. Molec. Biol. 22, 211-220
- Burmester T. and Scheller K. (1996). Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin and insect hexamerin and dipteran arylphorin receptor. J. Mol. Evol. 42, 713-728

Burmester T., Antoniewski C., Lepesant J.A. (1999). Ecdysone-regulation of synthesis and processing of fat body protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster*. Eur. J. Biochem. 262, 387-97

Burmester T. (1999). Identification, molecular cloning and phylogentic analysis if a non-respiratory pseudo-hemocyanin of *Homarus americanus*. J. Biol. Chem. 274, 13217-13222

Burmester T. (1999). Evolution and function of the insect hexamerins. Eur. J. Entomol. 96, 213-225

Burmester T. and Scheller K. (1999). Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. Naturwissenschaften. 86, 468-74

Burmester T. and Hankeln T. (1999). A globin gene of *Drosophila melanogaster*. Mol. Biol. Evol. 18, 1809-1811

Burmester T. (2000). Hämocyanine und Globine – Proteinfamilien im evolutiven Wandel (Habilitationsschrift)

Burmester T., Weich B. Reinhardt S. and Hankeln T. (2000). A vertebrate globin expressed in the brain. Nature 407, 520-523

Burmester T. (2001). Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. Mol. Biol. Evol. 18, 185-195

Burmester T. (2002) Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. J. Comp. Physiol. B. 172, 95-107

Burmester T., Ebner B., Weich B. and Hankeln T. (2002). Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol. Biol. Evol.* 19, 416-421

Buzy J., Gagnon J., Lamy P., Thibault E., Forest and Hudry-Clergeon G. (1995). Complete amino acid sequence of the Aa6 subunit of the scorpion *Androctonus australis* hemocyanin determined by Edman degradation and mass spectrometry *Eur. J. Biochem.* 233, 93-101

Campbell N.A. (2003). *Biologie*. Markl J. (ed.), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford

Chan H.M. and Weeks J.M. (1992). The subunit structural composition of Amphipod hemocyanin (Crustacea; Amphipoda; Talitridae. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 101, 567-292

Cuff M.E., Miller K.I., van Holde K.E., and Hendrickson W.A. (1998). Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. *J. Mol. Biol.* 278, 855-870

Dayhoff M. O., Schwartz R. M. and Orcutt B. C. (1978). A model of evolutionary change in proteins. In: *Atlas of Protein Sequence Structure* (Dayhoff M. O., Ed.) 5/3, 345-352. National Biomedical Research Foundation, Washington DC.

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

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

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

Destoumieux-Garzón D., Saulnier D., Garnier J., Jouffrey C., Bulet P., and Bachere E. (2001). Crustacean Immunity: Antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin to microbial challenge. *J. Biol. Chem.* 276, 47070-47077

- Dickerson R.E. and Geis I. (1983). Hemoglobin: Structure , function, evolution and pathology. Benjamin/Cummings Publ. Co., Ca
- Dohle W. (1997). Myriapod-insect relationships as opposed to an insect-crustacean sister group relationship. In R.A. Fortey and R.H. Thomas, eds. Arthropod relationships. Systematic Association Special Vol., Ser 55, 305-315
- Drexel R., Siegmund S., Schneider H.J., Linzen B., Gielens C., Lontie R., Kellermann J., and Lottspeich F. (1987). Complete sequence of of a functional unit from a molluscan hemocyanin (*Helix pomatia*). Biol.Chem. Hoppe-Seyler 368, 617-635
- Durstewitz G. and Terwilliger N.B. (1997). cDNA cloning of a developmentally regulated hemocyanin subunit in the crustacean *Cancer magister* and phylogenetic analysis of the hemocyanin gene family. Mol. Biol. Evol. 14, 266-276
- Ellerton H.D., Ellerton N.F., and Robinsom H.A. (1983). Hemocyanin - a current perspective. Prog Biophys Mol Biol. 41, 143-248.
- Fahrenbach W.H. (1970). The cyanoblast: hemocyanin formation in *Limulus polyphemus*. J. Cell Biol. 44, 445-453
- Engelhardt, W. (1996). Was lebt in Tümpel, Bach und Weiher?. Kosmos –Verlag, 178-183
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791
- Felsenstein J. (2001). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6alpha2. Distributed by the Author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle
- Friedrich and Tautz (1995). Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. Nature 376, 165-167
- García-Machado E., Pempera M., Dennebouv N., Oliva-Suarez M., Mounolou J.C., and Monnerot M. (1999). Mitochondrial genes collectivley suggest the paraphyly of Crustacea with respect to Insecta. J. Mol. Evol. 49, 142-149

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

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

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

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

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

Giribet G., Edgecombe G.D. and Wheeler W.C. (2001). Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. Nature 413, 157-161

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

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

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

Hastings W.K. (1970). "Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their application," Biometrika 57, pp. 97-109

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

Hembach A. (2002). Charakterisierung und Sequenzierung der Hämocyanine von *Gammarus roeseli* und *Scutigera coleoptrata*. Diplomarbeit an der Universität Mainz

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

Herberts C., de Frescheville J., (1981). Occurrence of hemocyanin in the rhizocephalan Crustacea *Sacculina carcini*. *ThompsonComp. Biochem. Physiol.* 70, 656-659

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

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

Holt R.A., Subramanian G.M., Halpern A., Sutton G.G., Charlab R., Nusskern D.R., Wincker P., Clark A.G., Ribeiro J.M., Wides R., et al. (2002). The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*, *Science* 298, 129-149

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

Huelsenbeck J.P., Larget B., Miller R.E., Ronquist F. (2002). Potential Applications and Pitfalls of Bayesian Inference of Phylogeny. *Syst. Biol.* 51, 673–688

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

- Hwang, U.W., Friedrich M., Tautz D., Park C.J. and Kim W. (2001). Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature* 413, 154-157
- Immesberger A., Burmester, T. (2004). Putative phenoloxidasen in the tunicate *Ciona intestinalis* and the origin of the arthropod hemocyanin superfamily. *J. Comp. Physiol.* 174(2), 169-80
- Jacobs M.P., Lontie R., and Preaux G. (1984). Isolation of an active haemocyanin-mRNA-containing fraction from *Cancer pagurus*. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 92, B 30
- Jacobs S. (2004). Molekulare Charakterisierung des Hämocyanins des Pfeilschwanzkreb-  
ses *Limulus polyphemus* Diplomarbeit an der Universität Mainz
- Jaenicke E., Decker H., Gebauer W., Markl J., and Burmester T. (1999). Identification, structure and properties of hemocyanin from diplopod Myriapoda. *J. Biol.Chem.* 274, 29071-29074
- Jaenicke E., Decker H. (2003). "Tyrosinases from crustacean form hexamers". *Biochem. J.* 371, 515-523
- Kaestner A. (1993). Lehrbuch der speziellen Zoologie; Band I Wirbellose Tiere; 4. Teil: Arthropoda. Gruner H.-E.(ed); Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart New York
- Kawabata T., Yasuhara Y., Ochiai M., Matsuura S., and Assida M. (1995). Molecular cloning of insect prophenoloxidase: a copper containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7774-7778
- Nagai T., Kawabata S. S. (2000). A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J. Biol. Chem.* 275, 29264-29267
- Kempton B., Markl J., Brenowitz M., Bonaventura C., Bonaventura J. (1985). Immunological correspondence between arthropod hemocyanin subunits, II. Xiphosuran (*Limulus*) and spider (*Eurypelma*, *Cupiennius*) hemocyanin. *Hoppe- Seyler's Z Physiol. Chem.* 366, 77-86

- Kimura M. (1983). The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, England
- Klok J. C., Mercer R. D. and Chown S. L. (2002). Discontinuous gas-exchange in centipedes and its convergent evolution in tracheated arthropods. *The Journal of Experimental Biology* 205, 1019-1029
- Kobert R. (1903). Über Hämocyanin nebst einigen Notizen über Hämyerithrin. *Pflueger's Arch. Physiol.* 98, 411-427
- Kukulova-Peck J. (1991). Fossil history and evolution of hexapod structures. Pp. 141-179 in I.D. Naumann (ed.). *The insects of Australia*. Melbourne University Press, Melbourne, Australia
- Kurtz D.M. jr (1999). Oxygen-carrying proteins: three solutions to a common problem. *Essays Biochem.* 34, 85-100
- Kusche K. and Burmester T. (2000). The hemocyanin superfamily of the Arthropoda. In: *Proceedings of the XIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins - IO2BiP* (Lallier, F. H., Zal, F., Toulmond, A., eds), Editions de la Station Biologique de Roscoff -France (ISBN 2-9518029-0-0)
- Kusche K., Burmester T. (2001). Molecular cloning and evolution of lobster hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 887-92
- Kusche K., Burmester T. (2001). Diplopod hemocyanin sequence and the phylogenetic position of the Myriapoda. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1566-73
- Kusche K., Ruhberg H., Burmester T. (2002). A hemocyanin from the Onychophora and the emergence of respiratory proteins. *Proc. Natl. Sci. USA.* 99, 10545-8
- Kusche K., Hembach A., Milke C., Burmester T. (2003). Molecular characterisation and evolution of the hemocyanin from the european spiny lobster, *Palinurus elephas*. *J. Comp. Physiol.* 173, 319-25

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

Lamy J, Lamy J, Sizaret PY, Maillet M, Weill J. (1977). Ultrastructure of 16 S substances obtained by reassociation using different combinations of three isolated subunits of scorpion hemocyanin (*Androctonus australis garzonii*). *J. Mol. Biol.* 117, 869-75

Lamy J, Lamy J, Weill J, Bonaventura J, Bonaventura C, Brenowitz M. (1979). Immunological correlates between the multiple hemocyanin subunits of *Limulus polyphemus* and *Tachypleus tridentatus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 324-39

Lamy J., Lamy J. Sizaret P.Y., Billiald P., Jolles P. Jolles J., Feldmann R.J. and Bonaventura J. (1983). Quaternary Structure of *Limulus polyphemus* Hemocyanin. *Biochemistry* 22, 5573-5583

Lamy J., Lamy J., Billiald P., Sizaret P.Y., Cave G., Frank J., Motta G. (1986). Approach to the direct intramolecular localization of antigenic determinants in *Androctonus australis* hemocyanin with monoclonal antibodies by molecular immunoelectron microscopy. *Biochemistry* 24, 5532-42

Langley K. E., Villarejo M. R., Fowler A. V., Zamenhof P. J., Zabin I. (1975). Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 72, 1254-1257

Lee, S.Y. und Söderhäll, K. (2001). Characterization of a Pattern Recognition Protein, a Masquerade-Like Protein, in the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Immunol.* 166, 7319-7326

Lee S.Y., Lee B.L., Söderhäll K. (2003). Processing of an Antibacterial Peptide from Hemocyanin of the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 278, 7927 - 7933.

Linzen B., Soeter N.M., Riggs A.F., Schneider H.J., Schartau W., Moore M.D., Behrens P.Q., Yokota E., Nakashima H., Takagi T., Nemoto T., Vereijken J.M., Bak H.J., Beintema

- J.J., Volbeda A., Gaykema W.P.J., Hol W.G.J. (1985). The structure of arthropod hemocyanins. *Science* 229, 519-524
- Loewe R. (1978). Hemocyanins in spiders. V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin. *J. Comp. Physiol. B* 128, 161-168
- Lottspeich F. und Zorbas H. (1998). *Bioanalytik*, Spektrum Verlag
- Magee J., Kraynack N., Massey H.C. Jr., Telfer W.H. (1994). Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 25, 137-57
- Mangum C.P. (1983). Oxygen transport in the blood. *The Biology of Crustacea*, Vol. 5 (Bliss D.E. and Mantel L.H., eds.) pp. 373-429, Academic Press
- Mangum C.P. (1985). Oxygen transport in Invertebrates. *Am. J. Physiol.* 248, 505-14
- Mangum C. P., Scott J.L., Black R.E.L., Miller K.I., and van Holde K.E. (1985). Centipedal hemocyanin: its structure and its implications for arthropod phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3721-3725
- Mangum C.P. and Godette G. (1986). The hemocyanin of the uniramous arthropods. In B Linzen, ed. *Invertebrate oxygen carriers*. Springer Verlag Berlin. 276-280
- Mangum C.P. (1992). Physiological function of hemerythrin. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 13, 173-192
- Mangum C.P. (1998). Major events in the evolution of the oxygen carriers. *Amer. Zool.* 38, 1-13
- Markl J. (1979). Markl J, Markl A, Schartau W, Linzen B (1979). Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: I (Chelicerata). *J. Comp. Physiol. B* 130, 283-292

- Markl J., Hofer A., Bauer G., Markl A., Kempter B., Brenzinger M., Linzen B. (1979). Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: II (Crustacea). *J. Comp. Physiol. B* 133, 167-175
- Markl J. (1980) Hemocyanins in spiders, XI. The quaternary structure of *Cupiennius* hemocyanin. *J. Comp. Physiol. B* 140: 199-207
- Markl J., Kempter B. (1981). Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. In: *Invertebrate oxygen-binding proteins*, Lamy J., Lamy J. (eds.), Marcel Dekker New York, 125-137
- Markl J., Decker H., Stöcker W., Savel A., and Linzen B. (1981b). On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.* 362, 185-188
- Markl J. (1986). Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol. Bull.* 171, 90-115
- Markl J., Stöcker W., Runzler R., and Precht E. (1986). Immunological correspondences between the hemocyanin subunits of 86 arthropods: Evolution of a multigene protein family. In: *Invertebrate Oxygen Carriers*, Linzen B. (ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 281-292
- Markl J, Stumpp S, Bosch FX, Voit R (1990) Hemocyanin biosynthesis in a tarantula, studied by in situ hybridization and immunocytochemistry. In: *Invertebrate dioxygen carriers* (Preaux G, Lontie R, eds). University Press, Louvain, Belgium, pp 497-502
- Markl J., and Decker H. (1992). Molecular structure of the arthropod hemocyanins. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, 13, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 325-376
- Markl J. (1996). Blaues Blut - Struktur, Funktion und Evolution der Hämocyanine. *Chemie in unserer Zeit* 30, 6-18

Martinez T., Burmester T., Veenstra J.A., Wheeler D. (2000). Sequence and evolution of a hexamerin from the ant *Camponotus festinatus*. *Insect Mol. Biol.* 9, 427-31

Metropolis N., Metropolis, A.W. Rosenbluth, M.N. Rosenbluth, A.H. Teller, and E. Teller (1953). "Equations of State Calculations by Fast Computing Machines". *Journal of Chemical Physics*, 21, 1087-1091

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

Nakashima H., Behrens P.Q., Moore M.D., Yokota E., Riggs A. (1986). Structure of hemocyanin II from the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. Sequences of the overlapping peptides, ordering the CNBr fragments, and the cor amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 261(23), 10526-33

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

Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10, 1-6

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

Paulus H.F. (1979). Eye structure and the monophyly of the arthropoda. In: AP Gupta (ed.) *Arthropod phylogeny*. Van Nostrand Reinhold Company, New York

Paulus, H.F. (2000). Phylogeny of the Myriapoda-Crustacea-Insecta: a new attempt using photoreceptor structure. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 38, 189-208

- Preaux G., Vandamme A., De Bethune B., Jacobs M.P. Lontie R. (1986). Haemocyanin-mRNA-rich fractions of cephalopodan Decabrachia and of Crustacea, their in vivo and in vitro translation. In: Linzen B (ed) Invertebrate oxygen carriers. Springer, Berlin, pp 485-488
- Presnell and Cohen (1989). Topological distribution of four-alpha-helix bundles. Proc Natl Acad Sci USA. 86, 6592-6596.
- Quagliariello G. (1923). Das Hämocyanin. Naturwissenschaften 14, 261-268
- Rannala B. and Yang Z., (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. J Mol Evol. 43, 304-11
- Rajulu G.S. (1969). Presence of hemocyanin in the blood of a centipede *Scutigera longicornis* (Chilopoda: Myriapoda). Curr. Sci. Bangalore 38, 168-169
- Regier J.C and Shultz J.W. (1997). Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of the Crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods. Mol. Biol Evol. 14, 902-913
- Richey B., Decker H., and Gill S.J. (1985). Binding of oxygen and carbon monoxid to arthropodan hemocaynin: an allosteric analysis. Biochemistry 24, 109-117
- Robinson R.A. (1990). Earliest-known uniramous arthropods. Nature 343, 163-164
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogentic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 1406-1425
- Sambrook J. and Russell D.W. (2001). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sánchez D., Ganfornina M.D., Gutiérrez G., and Bastani M.J. (1998).Molecular characterisation and phylogenetic relationship of a protein with oxygen-binding capacity in the grasshopper embryo. A hemocyanin in insects ? Mol. Biol. Evol. 15, 415-426

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

Scheller K., Fischer B. und Schenkel H. (1990). Molecular properties, functions and developmentally regulated biosynthesis of arylphorin in *Calliphora vicina*. In Hagedorn H.H. (ed.). Molecular Insect Science. Plenum Press, New York, pp. 155-162

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

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

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

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

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

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

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

- Spears T. and Abele L.G. (1997). Crustacean phylogeny inferred from 18S rDNA. In R.A. Fortey and R.H. Thomas, eds. *Arthropod relationships*. Systematic Association Special Vol., Ser. 55, 169-187
- Spicer J.I., Baden S.P. (2001). Environmental hypoxia and haemocyanin between-individual variability in Norway lobsters *Nephrops norvegicus* (L.). *Mar. Biol.* 139, 727–734
- Stoeva S., Dolashka P., Hristova R., Genov N., and Voelter W. (1999). Subunit composition and N-terminal analysis of arthropod hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 122, 69-75
- Swofford D.L., Olsen G.J., Wadell P.J., and Hillis D.M. (1996). Phylogenetic inference. In: *Molecular systematics*, Sinauer Ass., Inc., MA. Pp. 407-514
- Telfer W.H. and Kunkel J.G. (1991). The function and evolution of insect storage hexamers. *Ann. Rev. Entomol.* 36, 205-228
- Terwilliger N.B. (1998). Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *J. of Exp. Biol.* 201, 1085-1098
- Terwilliger N.B. (1999). Hemolymph Proteins and Molting in Crustaceans and Insekts. *Amer. Zool.* 39, 589-599
- Terwilliger N.B., Dangott L.J., and Ryan M.C. (1999). Cryptocyanin, a crustacean molting protein, and evolutionary links to arthropod hemocyanin and insect hexamerins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2013-2018
- Terwilliger N.B. and Ryan M. (2001). Ontogeny of Crustacean Respiratory Proteins. *Amer. Zool.* 41, 1057-1067
- Topham R., Tesh S., Westcott A., Cole G., Mercatante D., Kaufman, G. and Bonaventura C. (1999). Disulfide bond reduction: a powerful, chemical probe for the study of structure-function relationships in hemocyanins. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 261–266

- Turbeville J.M., Pfeifer D.M., Field K.G., and Raff R.A. (1991). The phylogentic status of arthropods, as inferred from 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 8, 669-686
- Van Holde K.E. and van Bruggen F.J. (1971). The hemocyanins. Pp1-53 in *Biological Macromolecules 5*. S.N Timasheff and G.D. Fasman (eds.) Marcel Dekker, New York
- Van Holde K.E. and Miller K.I. (1995). Hemocyanins. *Advances in Protein Chemistry* 47, 1-81
- Vinogradov S.N. (1985). The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocruorins and chlorocruorins). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 82, 1-15
- Voit R., Feldmaier-Fuchs G., Schweikardt T., Decker H., Burmester T. (2000). Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. *J. Biol. Chem.* 275, 39339-39344
- Volbeda A., Hol W.G.J. (1989). Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3,2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 209, 249-279
- Weber R.E., Vinogradov S.N. (2001). Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol. Rev.* 81, 569-628
- Westheide, Rieger (2003). *Spezielle Zoologie, Band I: Einzeller und Wirbellose Tiere*
- Wheeler W.C. (1990). Nucleid acid sequence phylogeny and random outgroups. *Cladistics* 6, 363-368
- Wheeler, W.C., Cartwright P. and Hayashi C.Y. (1993). Arthropod phylogeny: A combined approach. *Cladistics* 9, 1-39
- Wheeler W.C., Whiting M.F., Carpenter J.C., and Wheeler Q.D. (2001). "The phylogeny of the insect orders." *Cladistics*, 12, 1-57

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

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

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

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

Zrzavy, J. and Stys P. (1997). The basic body plan of arthropods: Insights from evolutionary morphology and developmental biology. Journal of Evolutionary Biology 10, 353-367.

## 7. Anhang

### 7.1 Verwendete Abkürzungen

|                       |                                                                     |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>A/mA</b>           | Ampere/Milliampere                                                  |
| <b>AP</b>             | Alkalische Phosphatase                                              |
| <b>APS</b>            | Ammoniumperoxodisulfat                                              |
| <b>AS</b>             | Aminosäure                                                          |
| <b>ATP</b>            | Adenosintriphosphat                                                 |
| <b>Aqua bidest</b>    | bidestilliertes Wasser                                              |
| <b>Aqua dest.</b>     | destilliertes Wasser                                                |
| <b>BCIP</b>           | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat                                   |
| <b>bp</b>             | Basenpaar                                                           |
| <b>BPB</b>            | Bromphenolblau                                                      |
| <b>cDNA</b>           | komplementäre Desoxyribonukleinsäure                                |
| <b>CIA</b>            | Chloroform-Isoamylalkohol                                           |
| <b>Da</b>             | Dalton                                                              |
| <b>dCTP</b>           | 2'-Desoxy-Cytosintrisphosphat                                       |
| <b>ddNMP</b>          | Didesoxy-Nukleosidmonophosphat                                      |
| <b>ddNTP</b>          | Didesoxy-Nukleosidtriphosphat                                       |
| <b>DEPC</b>           | Diethylpyrocarbonat                                                 |
| <b>DMSO</b>           | Dimethylsulfoxid                                                    |
| <b>DNA</b>            | Desoxyribonukleinsäure                                              |
| <b>dNTP</b>           | Desoxy-Nukleosidtriphosphat                                         |
| <b>DS</b>             | Downstream                                                          |
| <b><i>E. coli</i></b> | <i>Escherichia coli</i>                                             |
| <b>EDTA</b>           | Ethylendiamintetraessigsäure                                        |
| <b>EtBr</b>           | Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) |
| <b>g</b>              | Erdbeschleunigung                                                   |
| <b>GITC</b>           | Guanidinthiocyanat                                                  |
| <b>Hc</b>             | Hämocyanin                                                          |
| <b>IEP</b>            | Isoelektrischer Punkt                                               |
| <b>Ig</b>             | Immunglobulin                                                       |
| <b>IgG</b>            | Immunglobulin G                                                     |

|                   |                                                      |
|-------------------|------------------------------------------------------|
| <b>IPTG</b>       | Isopropyl-1-Thio-β-D-Galactopyranosid                |
| <b>Kan</b>        | Kanamycin                                            |
| <b>kb</b>         | Kilobasen                                            |
| <b>kDa</b>        | Kilodalton, 10 <sup>3</sup> Dalton                   |
| <b>LB</b>         | Luria-Bertani                                        |
| <b>M/mM</b>       | Molar/Millimolar                                     |
| <b>MCS</b>        | multiple cloning site                                |
| <b>MOPS</b>       | Morpholino-Propan-Sulfonsäure                        |
| <b>mRNA</b>       | messenger RNA                                        |
| <b>MYA</b>        | Million years ago                                    |
| <b>NBT</b>        | Nitroblautetrazoliumchlorid                          |
| <b>NZY</b>        | Nitrosamine-Yeast                                    |
| <b>OD</b>         | optische Dichte                                      |
| <b>ORF</b>        | open reading frame                                   |
| <b>PAGE</b>       | Polyacrylamidgelelektrophorese                       |
| <b>PAM</b>        | Percent accepted mutation                            |
| <b>PCR</b>        | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| <b>pfu</b>        | Plauebildende Einheiten (plaque forming units)       |
| <b>RNA</b>        | Ribonukleinsäure                                     |
| <b>rRNA</b>       | Ribosomale RNA                                       |
| <b>Rpm</b>        | Umdrehungen je Minute (rounds per minute)            |
| <b>RT</b>         | Raumtemperatur                                       |
| <b>SDS</b>        | Natriumdodecylsulfat                                 |
| <b>SM</b>         | Sodium chloride/Magnesium sulfate                    |
| <b>STE</b>        | Sodium (NaCl)-Tris-EDTA                              |
| <b>TBE-Puffer</b> | Tris-Borat-EDTA-Puffer                               |
| <b>TBS/TBST</b>   | tris buffered saline/Tween                           |
| <b>Tdo</b>        | Thermobia domestica                                  |
| <b>TEMED</b>      | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                   |
| <b>Tet</b>        | Tetracyclin                                          |
| <b>TM</b>         | Warenzeichen (Trademark)                             |
| <b>Tris</b>       | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                       |
| <b>tRNA</b>       | Transfer RNA                                         |
| <b>U</b>          | Unit                                                 |
| <b>US</b>         | upstream                                             |

|              |                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------|
| <b>UTR</b>   | untranslated region                             |
| <b>UV</b>    | Ultraviolett                                    |
| <b>V/mV</b>  | Volt/Millivolt                                  |
| <b>w/v</b>   | Gewicht pro Volumen (weight/volume)             |
| <b>X-Gal</b> | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid |

### 7.1.2 Außerhalb der Stammbäume verwendete Abkürzungen der Speziesnamen

| Abkürzung  | Spezies                         |
|------------|---------------------------------|
| <b>Agi</b> | <i>Archispirostreptus gigas</i> |
| <b>Gro</b> | <i>Gammarus roeseli</i>         |
| <b>Lpo</b> | <i>Limulus polyphemus</i>       |
| <b>Pma</b> | <i>Perla marginata</i>          |
| <b>Sco</b> | <i>Scutigera coleoptrata</i>    |
| <b>Tdo</b> | <i>Thermobia domestica</i>      |

## 7.2 Der genetische Code

|     |     |     |     |     |      |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| UUU | Phe | UCU | Ser | UAU | Tyr  | UGU | Cys |
| UUC |     | UCC |     | UAC |      | UGC |     |
| UUA |     | UCA |     | UAA |      | UGA |     |
| UUG | Leu | UCG | Pro | UAG | Stop | UGG | Trp |
| CUU |     | CCU |     | CAU | His  | CGU | Arg |
| CUC |     | CCC |     | CAC |      | CGC |     |
| CUA |     | CCA |     | CAA | Gln  | CGA |     |
| CUG |     | CCG |     | CAG |      | CGG |     |
| AUU | Ile | ACU | Thr | AAU | Asn  | AGU | Ser |
| AUC |     | ACC |     | AAC |      | AGC |     |
| AUA | Met | ACA |     | AAA | Lys  | AGA | Arg |
| AUG |     | ACG | Ala | AAG |      | AGG |     |
| GUU | Val | GCU |     | GAU | Asp  | GGU | Gly |
| GUC |     | GCC |     | GAC |      | GGC |     |
| GUA |     | GCA |     | GAA | Glu  | GGA |     |
| GUG |     | GCG |     | GAG |      | GGG |     |

### 7.3 Abkürzungs-codes der Aminosäuren

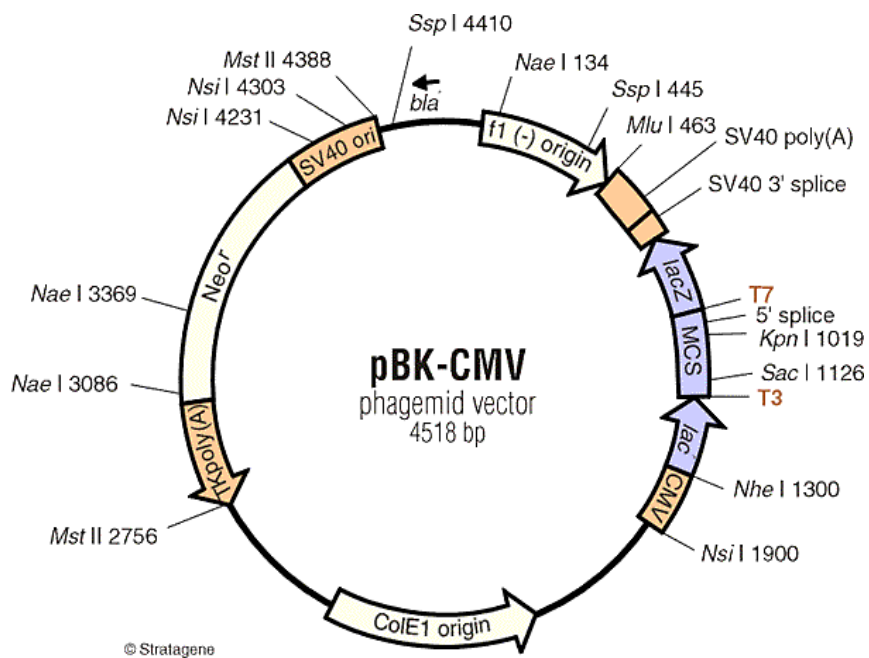
|          |     |              |          |     |            |
|----------|-----|--------------|----------|-----|------------|
| <b>A</b> | Ala | Alanin       | <b>M</b> | Met | Methionin  |
| <b>C</b> | Cys | Cystein      | <b>N</b> | Asn | Asparagin  |
| <b>D</b> | Asp | Aspartat     | <b>P</b> |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

### 7.4 Abkürzungs-codes für degenerierte Nukleotide

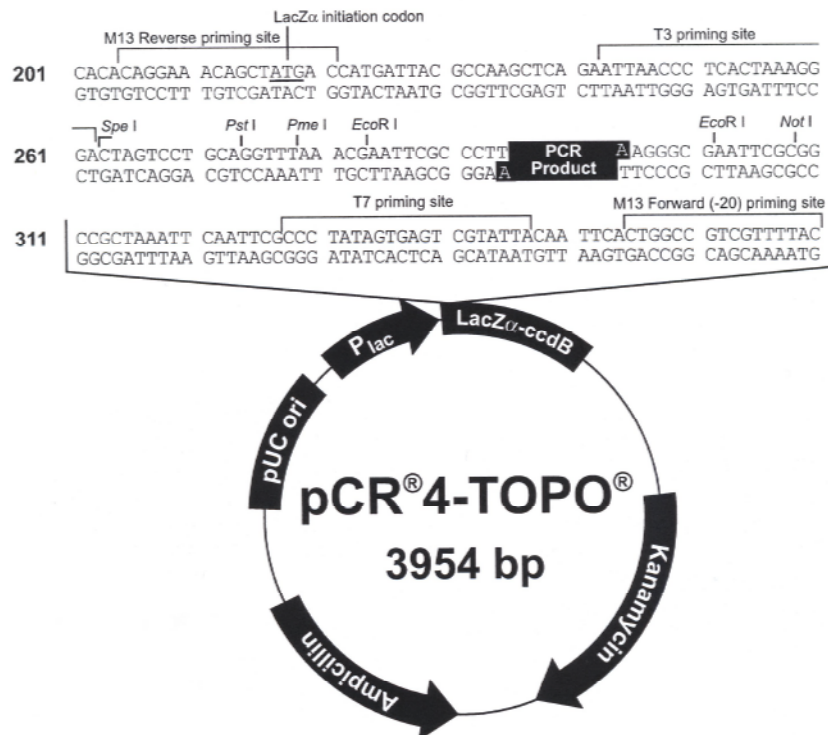
|          |                            |
|----------|----------------------------|
| <b>M</b> | <b>A oder C</b>            |
| <b>R</b> | <b>A oder G</b>            |
| <b>W</b> | <b>A oder T</b>            |
| <b>S</b> | <b>C oder G</b>            |
| <b>Y</b> | <b>C oder T</b>            |
| <b>K</b> | <b>G oder T</b>            |
| <b>N</b> | <b>Alle vier Nukeotide</b> |
| <b>B</b> | <b>Nicht A</b>             |
| <b>D</b> | <b>Nicht C</b>             |
| <b>H</b> | <b>Nicht G</b>             |
| <b>V</b> | <b>Nicht T</b>             |

## 7.5 Vektorkarten

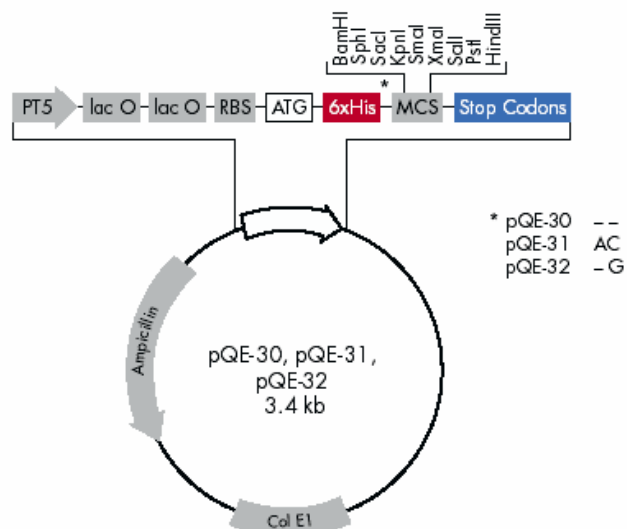
### 7.5.1 Vektorkarte des pBK-CMV-Vektors



### 7.5.1 Vektorkarte des pCR® 4-TOPO®-Vektors



### 7.5.2 Vektorkarte des PQE 30-32



## 7.6 Primer

### 7.6.1 Degenerierte Primer

| Bezeichnung     | Sequenz 5' - 3' Richtung      |
|-----------------|-------------------------------|
| Stoneflyfw1     | GAGGGNSAGTTCGTNTACGC          |
| Stoneflyfw2     | CCNCCNCCNTAYGARRTCTACCC       |
| Stoneflyrev1    | GAANGGYTTGTGGTTNAGRCG         |
| Stoneflyrev2    | TCGTACTTGGGTCCNAGGAAGAC       |
| Ofenfisch fw    | TGGCAYATGGAYTTYCCBTTYTGGTGG   |
| Ofenfisch rev 1 | CTNGTNGCNGTYTCRAAGTGCTCCAT    |
| Ofenfisch rev 2 | GGGTCNCTNGTNGCNGTYTCRAAGTGCTC |
| Gro rev 1       | CNKTCCANTTANTSCCTTGTGG        |

### 7.6.2 Andere Primer zur PCR

| Bezeichnung                     | Sequenz 5' - 3' Richtung              |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| Steinfliege bur 82 intern       | GTCACCAAGGATAGGCGAGGAGAA              |
| Steinfliege hc 1 forward        | CAC CAG ATG ATC GCC CGA TAC GAC       |
| Steinfliege hc 1 revers         | TTC ACG GGG AAG CGG GCC CAT CTC       |
| Steinfliege hc 2 forward        | TTG AGA TGG ACC GCT TCC CCG TG        |
| Steinfliege hc 2 revers         | ATG GTT GTG AAC AGG TGT CGA G         |
| Steinfliege hc 1 rev 2          | TGT TAA GTT GTC CAG GAA TGT GAG       |
| Steinfliege hc 2 rev 2          | ATC CCA CAG ACT GAA GGT TGT CCA       |
| Steinfliege hc mit KPN I        | CCA GGT ACC TAT GAA GTC TAC CCT       |
| Steinfliege rev hc mit Hind III | TTG AAG CTT GGA GGC AGC AGG TCC       |
| Ofenfisch race rev 1            | TCA ATA CCT CTG GTG TCA TTC AAG T     |
| Ofenfisch race rev 2            | TAT CCT TTC ATA TCT TCG ATG GTC AAC C |
| Ofenfisch race rev 3            | TCC CTG AAC GAT TGG TTT CTC CCA G     |
| Ofenfisch fw 1                  | CTT GAA TGA CAC CAG AGG TAT TGA       |
| Ofenfisch fw 2                  | AGT TAC TGA TTA CAG CCT TAA ATA TG    |
| Ofenfisch generacer rev         | ACT ACA GGG ATC AAC ACT TTG GGT G     |
| Ofenfisch generacer fw          | GTT CTC CCT TCC TGT CCT TCT CCA CTC   |
| Ofenfisch neu rev 1             | CCA CTC CGT ACT CGG GTT TCC AC        |

|                                   |                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Ofenfisch neu rev 2               | CGA GCA GGG AAT TCT CCA CCC         |
| Agi intern fw 1                   | TAGAGTGGATTACTTCACCGAAGA            |
| Agi intern rev 1                  | TTGTCTTCATCGTAGTTGGTGGCCA           |
| Agi intern fw 2                   | CATGGCCAGATGTTGTCATCGATGGTA         |
| Agi intern rev 2                  | TAC CAT CGA TGA CAA CAT CTG GCC ATG |
| Scutigera rev 1                   | TCTTAACTCTCACCATTACCATTGG           |
| Scutigera rev 2                   | GTTTCTCAAGCACAAAGGTCATCG            |
| Scutigera rev 1 A                 | CCAATGGTAATGGTGAGAGTTAAGA           |
| Scutigera rev 2 A                 | CGATGACCTTGTGCTTGAGAAAC             |
| Scutigera intern 1                | CGGGTTATGCTCCACATCTTACCA            |
| Scutigera intern 2                | GTC TTA ACT CTC ATC ATC ATC ACT G   |
| Scutigera intern 3                | CAGCTTATGCGTCCTTGACTTC              |
| Gro fw 1                          | CGACTGGAGCACGAGGACACTGACATG         |
| Gro fw 2                          | CGACTGGAGCACGAGGACA                 |
| Gro rev 2                         | TGAATCAACACCCAGAAGATGG              |
| Gro rev 3                         | CGGATATGCCTTTAAAAAGAAACAAGA         |
| Gro fw 2 coding                   | GTTGTGTCTCGCGGCGACCAGTGC            |
| Lim 3 (intern)                    | CTC ATC TGA CTC ATG TTG CTA G       |
| Lim 5 (intern)                    | GCC ATT AGA TGA CAC ACG AGG         |
| Lim 7 (intern)                    | GGA AAG AAT CCA TGA CGC CAT CG      |
| Steinfliege 23586 fw              | GGT CAA GCC CTT CTC TTA CTT CG      |
| Steinfliege 23586;23593;23587 rev | ATC TGG CGG GCC TGG ATG TTG AC      |
| Steinfliege 23593 fw              | GGA GAC TCA AGC ACT TCG ACT GGT T   |
| Steinfliege 23587 fw              | CTG GAT ACG AGC CAT CTC TGC GC      |
| Steinfliege 23588 fw              | TGC CCA GTT ATG AGT CCT GCC TCA     |
| Steinfliege 23588 rev             | AAC TGA CGG GCA CGG ATG TCC AC      |
| Sflhexamerinprimer für 5´ 114-117 | AAG TAG AAG ACA TCG AAC AAG TGG     |
| Sflhexamerinprimer für 5´ 119     | GGA AAA AGC ATA CAC GAA CAT ACC     |
| Sflhexamerinprimer für 5´ 118     | GCG TTG TAC CAG GAG GGA TAG AA      |
| Ofenfisch Hexamerin fw 1          | GAA GGA AAG ACC GTA AGG GAG AG      |
| Ofenfisch Hexamerin rev 1         | TAT CAA CTT CTA CAT TCA CCA C       |
| Ofenfisch Hexamerin fw 2          | TCG CCA AGA CAT CCA GGA ACA AGG AG  |

|                                     |                                              |
|-------------------------------------|----------------------------------------------|
| Ofenfisch Hexamerin rev 2           | CTT TCA GTT GGA GGG TAT CTG GGC              |
| AAP                                 | GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIGGGIIG        |
| AUAP                                | GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC                   |
| AUAP-GGG*                           | GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GG               |
| AUAP-TTT*                           | GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TT               |
| AP                                  | GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT dT <sub>16</sub> |
| GeneRacer™ 5' Primer                | CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA               |
| GeneRacer™ 5' Nested Pr.            | GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA           |
| Oligo-dT-Primer (dT <sub>16</sub> ) | TTT TTT TTT TTT TTT T                        |
| T3-Primer                           | ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA                   |
| T7-Primer                           | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG                   |
| M13 Forward (-20)                   | GTA AAA CGA CGG CCA G                        |
| M13 Reverse                         | CAG GAA ACA GCT ATG AC                       |
| SP6-Primer                          | ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA                   |

## 7.7 Verwendete Antikörper

| Antigen                                        | Zweitantikörper | Verdünnung<br>Western-Blot | Verdünnung<br>Screening |
|------------------------------------------------|-----------------|----------------------------|-------------------------|
| Spirostreptus-Hämocyanin                       | α-Meerschwein   | 1:200 000                  | 1: 20 000               |
| Hummer-Hämocyanin                              | α-Kaninchen     | 1:1000/1:5000              | -                       |
| Limulus- Hämocyanin                            | α-Kaninchen     | 1: 100 000                 | 1: 25 000               |
| Flusskrebs-Hämocyanin gesamt /<br>UE 3/4; UE 2 | α-Kaninchen     | 1:1000/1:5000              | -                       |
| <i>Perla marginata</i> -Hämocyanin             | α-Kaninchen     | 1:100 000                  | 1: 10 000               |
| Spinnenläufer -Hämocyanin                      | α-Kaninchen     | 1: 50 000                  | 1: 5000                 |
| Languste-Hämocyanin                            | α-Kaninchen     | 1:1000/1:5000              | -                       |
| Taschenkrebs-Hämocyanin                        | α-Kaninchen     | 1:1000/1:5000              | -                       |

## 7.8 Quellenverzeichnis der Internetabbildungen

*Archispirostreptus gigas*:

<http://perso.wanadoo.fr/serge.mallet/gigas.html>

*Gammarus roeseli*:

[http://www.acqueinterne.it/temp/images/img\\_laghi/gammarus.JPG](http://www.acqueinterne.it/temp/images/img_laghi/gammarus.JPG)

*Perla marginata*:

<http://www.arthropods.de/insecta/plecoptera/perlidae/perlaMarginata0001.jpg>

*Thermobia domestica*:

<http://www.faunistik.net/DETINVERT/ZYGENTOMA/IMAGES/thermobia.domesticaad01.jpg>

*Limulus polyphemus*:

[http://www.calacademy.org/science\\_now/images/horseshoe1.jpg](http://www.calacademy.org/science_now/images/horseshoe1.jpg)

## 7.9 Aus der Arbeit bislang hervorgegangene Publikationen und Kongressbeiträge

### Veröffentlichungen:

Kusche K., Hembach A., Hagner-Holler S., Gebauer W., Burmester T. (2003). Complete subunit sequences, structure and evolution of the 6x6-mer hemocyanin from the common house centipede *Scutigera coleoptrata*. Eur. J. Biochem. 270, 2860-2868

Hagner-Holler S., Schoen A., Erker W., Marden J.H., Rupprecht R., Burmester T. (2004). A respiratory hemocyanin from an insect. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 871-874

### Poster und Vorträge

Hagner-Holler, S., Kusche, K., Hembach, A., and Burmester, T. (2003) Structure and evolution of myriapod hemocyanins. 96. *Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Berlin*. Abstract map, p. 194

Hagner-Holler, S., Kusche, K., and Burmester, T. (2003) Structure and evolution of myriapod hemocyanins. *XIII<sup>th</sup> International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Mainz*. Abstract map. p. 102

Hagner-Holler, S., Schoen, A., Jaenicke, E., Rupprecht, R., Decker, H., and Burmester, T. (2003) A hemocyanin from the stonefly *Perla marginata*. *XIII<sup>th</sup> International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Mainz*. Abstract map. p. 104

Hagner-Holler, S., Schoen, A., Decker, H., and Burmester, T. (2004) Occurrence and evolution of hemocyanins in insects. 97. *Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Rostock*. Abstract map, p. 30

Burmester, T., and Hagner-Holler, S. (2004) A respiratory hemocyanin from the stonefly *Perla marginata*. *XXII<sup>th</sup> International Conference of Entomology, Brisbane, Australia*.

## 7.10 Multisequenzalignments

### 7.10.1 Alignment der cDNA-Sequenzen von *Gammarus roeseli*

```

22073 : CAGAGGTCCCTTGTGTCCCAATAGAGCTCAATGATCCCTGTGGGTCCCAAGTCCCCGGGTCTTCCCGAGCTCCCCGGGT : 80
22074 : -----GGGGTATTACACGGTTATCATCTTGACCGAAAGGGAAGAACT : 42
22038 : -----TATTCATACGGTTATCATCTTGACCGAAAGGGAAGAACT : 38
22033 : ----- : -
22035 : ----- : -
22036 : -----ATTCAATATGGTTATCATCTTGACCGAAAGGGAAGAACT : 37
22039edit : -----GCATCTAGATTTCCCTTCTGGTGGGAGGCTCTCTACGGTTACCATCTTGACCGCAAGGGTGAAC : 66
22039 : -----TGGGAGGCTCTCTACGGTTACCATCTTGACCGCAAGGGTGAAC : 44
221-5 : ----- : -
231 : ----- : -
231-5 : ----- : -
231-3 : ----- : -
241-5 : ----- : -
241-3 : ----- : -
271-5 : ----- : -
271-3 : ----- : -
213-5 : ----- : -
213-3 : ----- : -
213-3edit : ----- : -
251-5 : ----- : -
251-3 : ----- : -

22073 : CCCTCGAGACCCCTCGTCTCAGCTCGTCTCGGCTTGTCTCGAATCATTTCCGCCAGTCTCGGCTCGTCGCGACCAACTCG : 160
22074 : CTTTTCTGGGCCATCATCAGCTGACTGTCCGATTTGATTCTGAAAGGCTGTCCAACCACTGGACTTGCTCGACGAAC : 122
22038 : CTTTTTNTGGGCCATCATCAGCTGACTGTCCGATTTGATTCTGAAAGGCTGTCCAACCACTGGACTTGCTCGACGAAC : 118
22033 : ----- : -
22035 : ----- : -
22036 : -----GTTTCTGGGCCCATCATCAGCTGACTGTCCGATTTGATTCTGAAAGGCTGTCCAACCACTGGACTTGCTCGACGAAC : 117
22039edit : -----GTTTCTGGGCCCATCATCAGCTGACTGTCCGATTTGATTCTGAAAGGCTGTCCAACCACTGGACTTGCTCGACGAAC : 146
22039 : -----GTTTCTGGGCCCATCATCAGCTGACTGTCCGATTTGATTCTGAAAGGCTGTCCAACCACTGGACTTGCTCGACGAAC : 124
221-5 : ----- : -
231 : ----- : -
231-5 : ----- : -
231-3 : ----- : -
241-5 : ----- : -
241-3 : ----- : -
271-5 : ----- : -
271-3 : ----- : -
213-5 : ----- : -
213-3 : ----- : -
213-3edit : ----- : -
251-5 : ----- : -
251-3 : ----- : -

22073 : ACTCGCCTGAACATGTTTTTGTCTTATCTCGACGCACCTACACTACCTACAGGTATGGAGGTGAATTTCCCTACTCGTCCT : 240
22074 : TGTACTGGGACAGGCCATCGAAGACGGTTTCGCTCCTCATACTACCTACAGGTATGGAGGTGAATTTCCCTACTCGTCCT : 202
22038 : TGTACTGGGACAGGCCATCGAANACGGTTTCGCTCCTCATACTACCTACAGGTATGGAGGTGAATTTCCCTACTCGTCCT : 198
22033 : -----GCTCCTCATACTACCTACAGGTATGGAGGTGAATTTCCCACTCGTCCT : 48
22035 : -----GCTCCTCATACTACCTACAGGTATGGAGGTGAATTTCCCACTCGTCCT : 48
22036 : -----TGTACTGGGACAGGCCATCGAAGAGGGTTTCGCTCCTCATGCTACAGGTATGGAGGTGATTCCCACTCGTCCT : 197
22039edit : -----TGTACTGGGACAGGCCATCGAAGAGGGATTTCGCTCCTCATGCTACAGGTATGGAGGTGATTCCCACTCGTCCT : 226
22039 : -----TGTACTGGGACAGGCCATCGAAGAGGGATTTCGCTCCTCATGCTACAGGTATGGAGGTGATTCCCACTCGTCCT : 204
221-5 : ----- : -
231 : -----ATTTCCTACTCGTCCT : 16
231-5 : -----ATTTCCTACTCGTCCT : 16
231-3 : ----- : -
241-5 : ----- : -
241-3 : ----- : -
271-5 : ----- : -
271-3 : ----- : -
213-5 : ----- : -
213-3 : ----- : -
213-3edit : ----- : -
251-5 : ----- : -
251-3 : ----- : -

```



|           |   |                                                                                    |     |        |     |        |     |        |     |   |     |
|-----------|---|------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|---|-----|
| 22073     | : | -----*                                                                             | 580 | -----* | 600 | -----* | 620 | -----* | 640 | : | -   |
| 22074     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22038     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22033     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22035     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22036     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22039edit | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22039     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 221-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 231       | : | CTTCTTCAGGCTGCATAAGTACATGGACAACATGTTCAAGGAACACAAGGATTCCTTGCTCCTTACACAGCTGAAGAGA    |     |        |     |        |     |        |     | : | 416 |
| 231-5     | : | CTTCTTCAGGCTGCATAAGTACATGGACAACATGTTCAAGGAACACAAGGATTCCTTGCTCCTTACACAGCTGAAGAGA    |     |        |     |        |     |        |     | : | 416 |
| 231-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 241-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 241-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 271-5     | : | -----CATAAgTACATGGACAACATGTTCAAGGAACACAAGGATTCCTTGCTCCTTACACAGCTGAAGAGA            |     |        |     |        |     |        |     | : | 67  |
| 271-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 213-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 213-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 213-3edit | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 251-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 251-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
|           |   |                                                                                    |     |        |     |        |     |        |     |   |     |
| 22073     | : | -----*                                                                             | 660 | -----* | 680 | -----* | 700 | -----* | 720 | : | -   |
| 22074     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22038     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22033     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22035     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22036     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22039edit | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22039     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 221-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 231       | : | TTGGCTTCCAGGTGTTTCATCTGACTAGCGTGAGCATTGAAGGAGAAGTGGAAACGTTCTTCGAAGATTTGAATATGAT    |     |        |     |        |     |        |     | : | 496 |
| 231-5     | : | TTGGCTTCCAGGTGTTTCATCTGACTAGCGTGAGCATTGAAGGAGAAGTGGAAACGTTCTTCGAAGATTTGAATATGAT    |     |        |     |        |     |        |     | : | 496 |
| 231-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 241-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 241-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 271-5     | : | TTGGCTTCCAGGTGTTTCATCTGACTAGCGTGAGCATTGAAGGAGAAGTGGAAACGTTCTTCGAAGATTTGAATATGAT    |     |        |     |        |     |        |     | : | 147 |
| 271-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 213-5     | : | -----CAGGTGTTTCATCTAACTAGCTTCAGCATTGAAGGCGAATTGGAAACTTTCTTCGAAGATTCGAATTCGAT       |     |        |     |        |     |        |     | : | 71  |
| 213-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 213-3edit | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 251-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 251-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
|           |   |                                                                                    |     |        |     |        |     |        |     |   |     |
| 22073     | : | -----*                                                                             | 740 | -----* | 760 | -----* | 780 | -----* | 800 | : | -   |
| 22074     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22038     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22033     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22035     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22036     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22039edit | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22039     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 221-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 231       | : | TTGAAAAATGGCTGTAGATTCCAGCGAAGCTGTTGCTGAAAGTCGAAGTTAAAGCACACGTGGATCGCTTAAACCACAAAGA |     |        |     |        |     |        |     | : | 576 |
| 231-5     | : | TTGAAAAATGGCTGTAGATTCCAGCGAAGCTGTTGCTGAAAGTCGAAGTTAAAGCACACGTGGATCGCTTAAACCACAAAGA |     |        |     |        |     |        |     | : | 576 |
| 231-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 241-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 241-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 271-5     | : | TTGAAAAATGGCTGTAGATTCCAGCGAAGCTGTTGCTGAAAGTCGAAGTTAAAGCACACGTGGATCGCTTAAACCACAAAGA |     |        |     |        |     |        |     | : | 227 |
| 271-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 213-5     | : | TTGAAAAATGGCTGTGACTCCAGTGAAGCTGTGGATGAAGTTGATGTGAAGGCCATGTGTCTCGATTAAACCACAAAGA    |     |        |     |        |     |        |     | : | 151 |
| 213-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 213-3edit | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 251-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 251-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
|           |   |                                                                                    |     |        |     |        |     |        |     |   |     |
| 22073     | : | -----*                                                                             | 820 | -----* | 840 | -----* | 860 | -----* | 880 | : | -   |
| 22074     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22038     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22033     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22035     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22036     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22039edit | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22039     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 221-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 231       | : | TTTTGCTTATAATTCGATATCAAGAGCGACTCTGCTGACCAACACGCTGTCGTTTCGTGTCTTCCTTTGCTCCTCGGAGAG  |     |        |     |        |     |        |     | : | 656 |
| 231-5     | : | TTTTGCTTATAATTCGATATCAAGAGCGACTCTGCTGACCAACACGCTGTCGTTTCGTGTCTTCCTTTGCTCCTCGGAGAG  |     |        |     |        |     |        |     | : | 637 |
| 231-3     | : | -----ACCAACACGCTGTCGTTTCGTGTCTTCCTTTGCTCCTCGGAGAG                                  |     |        |     |        |     |        |     | : | 42  |
| 241-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 241-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 271-5     | : | TTTTGCTTACAATTCGATATCAAGAGCGACTCTGCTGACCAACACGCTGTAGTTCGTGTCTTCCTTTGCTCCTCGGAGAG   |     |        |     |        |     |        |     | : | 307 |
| 271-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 213-5     | : | TTTTGCTTATAATTTGATATCAAGAGCGATGCTGCTGATCAACACGCAAGTTGTTTCGCGTCTTCTGTGCCCCTGCTCGTG  |     |        |     |        |     |        |     | : | 231 |
| 213-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 213-3edit | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 251-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 251-3     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
|           |   |                                                                                    |     |        |     |        |     |        |     |   |     |
| 22073     | : | -----*                                                                             | 900 | -----* | 920 | -----* | 940 | -----* | 960 | : | -   |
| 22074     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22038     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22033     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22035     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22036     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22039edit | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 22039     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 221-5     | : | -----AATTCAAATTCACATTCGACGAGGGTCGCTGGAAGTGCATTGAAATGGACAAATTTTGGACAAAATTGCT        |     |        |     |        |     |        |     | : | 70  |
| 231       | : | ACAACAATGGAATTCATTCACATTCGACGAGGGTCGCTGGAAGTGCATTGAAATGGACAAATTTTGGACAAAATTGCT     |     |        |     |        |     |        |     | : | 736 |
| 231-5     | : | -----                                                                              |     | -----  |     | -----  |     | -----  |     | : | -   |
| 231-3     | : | ACAACAATGGAATTCATTCACATTCGACGAGGGTCGCTGGAAGTGCATTGAAATGGACAAATTTTGGACAAAATTGCT     |     |        |     |        |     |        |     | : | 122 |





## 7.10.2 Zur Konstruktion der Stammbäume verwendete Alignments

```

PlePP0 : -MQVTQKLLRRDTEMADAQKOLLYLFFERPYDPINAPRADGGSFIVAVAGA---DT----VA--TRFGVAPTSTVTPAR : 68
MjaPP0 : -----MNIEQQOLLYLFELPQOEPLNRPRGSGSVLVLEND---DT--PPVVT--TRIAGSPSIKLVQPER : 58
PmoPP0 : -----MANDQQRLLYLFLPQEDIQAPRGGSVLFKIESD---EA--PPSVA--TRVGVSPSVNLVPPER : 58
TmoPP0 : -----MASKNNIL-LLFDRPREPVFIAGSKKAVFSPTEYLAIDKYKPLGVALTNRFGEDADERIDVKKI : 64
BmoPP01 : -----MSDAKNLLFFDRPSEPCFMQKGEINAVFEIPNNYYPEKYQVRVSNAGNRFGSDAGRMIPIRNI : 65
GmoPP0 : -----MSDSKSRLLFFDRPSEPCFLQKGDVNAFEIPHHYSDKYKSLTNTLANRFGSGSEVRTIPVKNI : 65
SbuPP02 : -----MSKETNKIALALLFDRPLEPVFTARDGKAVFDIPSSYNEQYVDVDEITQTRFSEDVDIKIPLRDL : 67
EcaHc-a : -----MTI-LHDKVOALKKFEKLSVAATGEPFPADQID : 33
LpoHcII : -----MT-LHDKQIRTLKFEQLSSATVIGFGDKHKHS : 32
EcaHc-b : -----MPS-TAKORRLPFFFTSLSTDKFGILVQRD : 33
EcaHc-c : -----MPSDANIKARLLQDFHSTLSTAKFGLRVIRD : 34
EcaHc-d : -----MT-TAKARLLPFEKKTLSLSPDPEAEERD : 31
EcaHc-e : -----MP-DKQKLRVLSFEHNTSINT--PLPRDQID : 30
EcaHc-f : -----MT-VQKQRIPLFEHNTSLTK--GGDRTESD : 31
EcaHc-g : -----MAS-IPKQALILPFEKNTSLTK--ETPPRAQWD : 32
TtrHcA : -----TIK-KASITLALFEHNTSVPK--QHPPEKERD : 30
AauHc6 : -----TVA-KARLWPKFKHTALT--EKPLDORD : 30
CsaHc1 : -----M-AIKKVEKLPLFEKNTSLTK--QGLAPDORD : 31
CsaHc2 : -----M-TIKKADRTILPFEQNTSLTK--RQLPVDQRD : 31
CsaHc3 : -----M-TVKMYDRILPFEKNTSLTK--LQHPVEERD : 31
CsaHc4 : -----M-TIKKEORTILPFEHNTSLTK--HQLPVDQRD : 31
CsaHc5 : -----M-TVKKEADRTILPFEQNTTLTK--HQLPPEERD : 31
CsaHc6 : -----M-TIKKEORTILPFEHNTSLTK--QGLPEDORD : 31
HamHcA : -----TLVAAAAWPSFSYQNDASGDSTAKRQDDVNHLDRIYDHLHYSDDKQISETFSPEDATSMYDGGT : 67
PinHcB : -----DALGTGNAAKQDINHLLDKHYEPTTPYDKKIDIAENFNPLGDTSIYNDHGA : 51
PinHcA : -----DALGTGNAAKQDINHLLDKHYEPTTPYDKKIDIAENFNPLGDTSIYNDHGA : 51
PelHc1 : -----KVLVLCALVATAAAWPSFSGELTNGFQSDVHSSDNAKQDDVHLLDKHYEPTIDEKHNTAQTFDPVADTSIYGDVGA : 79
PelHc2 : -----KVLVLCALVATAAAWPSFSGELTNGFQSDVHSSDNAKQDDVHLLDKHYEPTIDEKHNTAQTFDPVADTSIYVDGA : 79
PelHc3 : -----KVLVLCALVATAAAWPSFSGELTNGFQSDVHSSDNAKQDDVHLLDKHYEPTIDEKHNTAQTFDPVADTSIYGDGA : 79
PelHc4 : -----MKVLVLCALVATAAAWPSFSGELTNGFQSDVHSSDNAKQDDVHLLDKHYEPTIDEKHNTAQTFDPVADTSIYVDGA : 80
CmaHc6 : -----TAGGAFDAKQHDVNSALWKYVEDIODPHILQSLQNFDPDL--SGHYDDGVD : 49
CsaHc : -----MKLLLLCALVAGASAWPNFGMADSPGGASNAKQHDVNSLWKYVEEDPHILKELSQSFDPDL--SGHYDDGVD : 73
PvaHc1 : -----LLALVAAAAWPNFGFQSDAGGESDAKQHDVNSLWKYGNIRYSDLKAKADSFDPAGRFGSYSDGGE : 69
PvaHc : -----MRVLVVLGLVAAAAFQVASADVQKQDLYLLKHYGDIODGGLATANSFDPVNLGYSYSDGGA : 65
PinHcC : -----ADCCAGDSADKLLAKQHDVNSLYVYKYGDIODHKLGETFNPQGDLLYHNDGA : 57
SamHc : -----MRLMWLAVLVVAVALGGAQAG--IGDVPADKPLMKQEVLRIRFKYHEPNRYKEQVELGNAYEPLNS-LPRYRNPA : 74
ScoHcA : -----MWSLALATLFLVLTGTVIRA-DQ--CPPVPADTKLEKLELIGHVNRPLT-PETPEPAGY : 56
ScoHcD : -----MDTRVRLRLTALVALSGVLA-DSESCSAIVNDYKLEKETEHLVDITNKPVY-PDFKQDTRGII : 62
ScoHcX : -----MKYCTESLTLILAVIGCISA-AINFKCPKGT-AEEKHCKETIYDVORTNRPIL-PDFKEPNFPTS--FLI : 65
ScoHcC : -----MGAWKVVTFATLALVAVKAYDEEAKCMSHDEDSQVKERQILHIVDSNKPIS-PDFRAPRGVI : 63
ScoHcB : -----MVAKWCVLAMLCLVAVGA-D--KCPRAT-DQEAQKRWLELHVNKPYV-AETKDPKIPAG : 57
SpiHc1 : -----MKFLILAVVLLATTAIA-E--KCPKPV-NVEAKQKMDTILSYHNKPAN-PVPPKPII : 53
AgIHc1 : -----MKFLVLAVALVLLATTAIA-E--KCPKPV-NVEAKQKMDTILSYHNKPAN-PVPPKPII : 53

```

```

PlePP0 : -PDADRRLLGRAPSYFGAIFSRIRARDCVIMKTONSTVQVAVSRHVNNEFVALFTILRKQELRG : 147
MjaPP0 : -NDVALODGTATSYFGISAFELASRRARAKDCVFMKISGAKVQVAVRHGVNNEFVALFVILRKELQSL : 137
PmoPP0 : -KDVTLQDGTATSYFGSAFEFIASRKAARDCCFFMKISGAEVQVAVRHGVNNEFVALFVILRKELQSL : 137
TmoPP0 : -SIPPEGILESDENESFIPRRIRAGRIIFLGMRIQDLVSAYVAVRVNPNFVALVAILHRPPTOD : 140
BmoPP01 : -ALPNLDPMEFYNEOSFVPHRKLAGRIIFMGMRVDELOSVCYCOLRNPYNFVGLVAILHRPPTKG : 141
GmoPP0 : -ALPDLPLQLPYNDOSFVAHRRMAGKLIIFINMRVDLISLCSYCOMRVNPNFVGLVAILHRPPTKG : 141
SbuPP02 : -KQKPDLSFTRPLGRRKQSFNNIRREIARLIIFMSTPTELEATATCYKRVNPFQVCFVATQHRKQTS : 144
EcaHc-a : -ERIRITTLGPNEFSQFYPDHLQAKRYVEFCHAAFDQFVSLAKQARSFMNSTFAFSAEVALHREDQCG : 107
LpoHcII : -DRKHWKQOPGATFSQFPHLEEARHLYEFWEAGFNQFIETAKEARTFVNEGLFAFAAEVAVLHRDQCG : 106
EcaHc-b : -PRAGLVLRGVRFSQFHEELKEATQLYEVUECESFEFLDCHQARFYVNEGLFYAVVAILHRDQCG : 107
EcaHc-c : -PKAGIITLGRGKFSQFHEELKEASRLAEVLVGRNETFDLCHQCRQFVNEGLFYVSLVAILHRPDCG : 108
EcaHc-d : -PRKGVGRFGRTFSQFHEELAEATELAEALVGAKNFDQFALANARAVVNEGLFYAFAMVAILSRDQCG : 105
EcaHc-e : -ARHILRRFOGEFSQFHEELAEATELYITAKLFDVHILAKQSRFTVNEGLFYAVVAILHRDQCG : 104
EcaHc-f : -VRRVGRFAGTFSQFHEELKKAATELYLYKADSFADFIHQAQARIVNEGLFYVAVVAILHRDQCG : 105
EcaHc-g : -PRAGVGRFAGTFSQFHEELKKAATELYLYKADSFADFIHQAQARIVNEGLFYVAVVAILHRDQCG : 106
TtrHcA : -NRHGVHSGKLSGIRELEATHYELHANKFDQLLKQARQFVNEGLFYAVVAILHRDQCG : 104
AauHc6 : -ERKGVGRFGRTFSQFHEELAEATELYLYGAKDFNDFHICEQARIVNEGLFYAVVAILHRDQCG : 104
CsaHc1 : -PRASVGRFGRTFSQFHEELAEATELYLYRANFDQFLKLAQARVANEGLFYAVVAILHRDQCG : 105
CsaHc2 : -PRAAAGRFGRTFSQFHEELKKAATELYLYSANGFDQFLKLAQARIVNEGLFYVAVVAILHRDQCG : 105
CsaHc3 : -PRAAVGRFGRTFSQFHEELAEATELYLYFAANDFDQFLKLAQARIVNEGLFYVAVVAILHRDQCG : 105
CsaHc4 : -PRAAASHFGRTFSQFHEELAEATELYLYFGANDFDQFLKLAQARIVNEGLFYVAVVAILHRDQCG : 105
CsaHc5 : -PRVHAGRFGRTFSQFHEELAEATELYLYAAKDFDQFLKLAQARIVNEGLFYVAVVAILHRDQCG : 105
CsaHc6 : -PRAAASHFGRTFSQFHEELAEATELYLYAANDFDQFVHARQARIVNEGLFYVAVVAILHRDQCG : 105
HamHcA : AAHLMEEINDHRLLEQHMFSEFNPORAEALMLFVIMHCKSWECVDNAFFRFRMNEGEFVALYVSVIHSKLG : 131
PinHcB : AAELMKENHRLLEQRHMFSEFNTORAEALMLFAVNQCKEYCRSNAYFRFRMNEGEFVALYVSVIHSKLG : 131
PinHcA : AVETLMKENHRLLEQRHMFSEFNTORKEALMLFAVNQCKEYCRSNAYFRFRMNEGEFVALYVSVIHSKLG : 131
PelHc1 : AAKTLMQENHRLLEQHMFSEFNTORAEALMLFTVNQCKDWNCINNAAFFRFRMNEGEFVALYVSVIHSKLG : 159
PelHc2 : AAKTLMQENHRLLEQHMFSEFNTORAEALMLFTVNQCKDWNCINNAAFFRFRMNEGEFVALYVSVIHSKLG : 159
PelHc3 : AAKTLMQENHRLLEQHMFSEFNTORAEALMLFTVNQCKDWNCINNAAFFRFRMNEGEFVALYVSVIHSKLG : 159
PelHc4 : AAKTLMQENHRLLEQHMFSEFNTORAEALMLFTVNQCKDWNCINNAAFFRFRMNEGEFVALYVSVIHSKLG : 160
CmaHc6 : AAKRLMKENHRLLEQHMFSEFNTORAEALMLFVLEHSTISTAGNAFFRFRMNEGEFVALYVAVIHSKLT : 129
CsaHc : AAKRLMKENHRLLEQHMFSEFNTORAEALMLFVLEHSTISTAGNAFFRFRMNEGEFVALYVAVIHSKLT : 153
PvaHc1 : AVQKLVREKQKLLQQRHMFSEFNPORAEALMLFVSIHCKDWNTYSNAYFRFRMNEGEFVALYVAVIHSKLT : 149
PvaHc : AVQKLVQDNGKLLQQRHMFSEFNTORAEALMLFVSIHCKDWNTYSNAYFRFRMNEGEFVALYVAVIHSKLT : 145
PinHcC : SVNTLMADFKGRLLOKHMSEFNTORAEALMLFVIMNCKWHAFVSNAYFRFRMNEGEFVALYVSLIHSKLT : 137
SamHc : PVKQLVRLYRAGSLPAGATETFDITIRQOMILLESLLYNNWETFLRTAWARVRNNEGEFVALYVAVLHRE : 154
ScoHcA : ---DE-TKIKGLGLFOHETFSFDEITWPEATKAATFIMEATFETFIQRAVDILIRINEDFVALYVAVLHRE : 132
ScoHcD : ---DE-SKIKGLGLPRREFSFDEHWAEAAKVVLELPKTERFIHADIIHVRINEDFVALYVAVLHRE : 138
ScoHcX : KGKDPKEFFQAIHLPKKEFSFDEHWAEAMTAYELYEATLDFIDAKILYHLHNEFYVVFVAVLHRE : 145
ScoHcC : ---DE-HKIKGLGLKRETFFSFDEHWAEASKVRLLDKDFDIDAEVIRLRNNEFYVVFVAVLHRE : 139
ScoHcB : ---SE-DVFKLGLLEHHEFSFDEQWLEATTAAVYLLTAPSFDFIDRAEIVRIRINEDFYVVFVAVLHRE : 133
SpiHc1 : ---DP-KKIKGILPXDDFSFDEITWLEVSEVLKRFMAPTFEFIKVAETLYPHVNEDEFGLSVAIVHRE : 129
AgIHc1 : ---DP-KKIKGILPXDDFSFDEITWLEVSEVLKRFMAPTFEFIKVAETLYPHVNEDEFGLSVAIVHRE : 129

```

```

PlePP0 : VRLPILVEYPHFPMEDITSMOVEVNRTP-PTATTPVLEYGPEFANTNQKAEIRVSWEDFGINHHWHLYPI : 226
MjaPP0 : VRLSFVEVPSFPOETLAKQIRINRMD-PQOREPVIEHGLEFSITHLKEIRLSWVEDGLSVHHWHLYVPV : 226
PmoPP0 : VRLPIMVEVPSFPOETLAKQIRINRMD-PQOTEPVIEHGLEFSITHLKEIRISWVEDGINVHHWHLYYPP : 226
TmoPP0 : VRLSFIESPDYDAKVFQAREQATVVP-EGSRAPTEI--PKDYIASDLSEELAYFEDGINVHHWHLYYPP : 227
BmoPP01 : LSTPTFAESPDYDPKVFQAREVSSVVP-SGARMPVIT--PSNYIASDTSEERVAYFEDGINVHHWHLYYPP : 228
GmoPP0 : LQVPVVEITPDYDPKVFQARETTTVNA-SGNRMPITIT--PTNYIASNSSEERVAYFEDGINVHHWHLYYPP : 228
SbuPP02 : FVVKIATETPQTEPAVFKDARAEGEVV/PNPGDRRHTEI--PRNYIASDRSEERLGVFEDIGVNHWHLYYPP : 222
EcaHc-a : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
LpoHcII : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
EcaHc-a : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
EcaHc-b : VSLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
EcaHc-c : VSLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
EcaHc-d : VSLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
EcaHc-e : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
EcaHc-f : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
EcaHc-g : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
TtrHcA : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
AauHc6 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
CsaHc1 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
CsaHc2 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
CsaHc3 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
CsaHc4 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
CsaHc5 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
CsaHc6 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
HamHcA : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
PinHcB : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
PinHcC : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
PelHc1 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
PelHc2 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
PelHc3 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
PelHc4 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
CmaHc6 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
CsaHc : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
PvaHc1 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
PvaHc : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
PinHcC : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
SamHc : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
ScoHcA : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
ScoHcD : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
ScoHcX : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
ScoHcC : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
ScoHcB : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
SpiHc1 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222
AgiHc1 : LVVLPVVEVADYFPAQSLIKAFITLATTTPQGDSDITLV--DVQDIGNILDYKLAYFEDIGVNHWHLYYPP : 222

PlePP0 : EMH-----VNDRKGELFYMHQOQVARYDNERLSVNLNRVKEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
MjaPP0 : GMG-----VDRKGELFYMHQOQVARYDNERLSVNLNRVKEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
PmoPP0 : AMG-----FDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
TmoPP0 : EAARE-----VVAARRGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
BmoPP01 : DAARA-----IVNDRRGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
GmoPP0 : EAA-RE-----IVKDRRGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
SbuPP02 : NG-PIE-----VVKDRRGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
EcaHc-a : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
LpoHcII : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
EcaHc-b : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
EcaHc-c : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
EcaHc-d : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
EcaHc-e : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
EcaHc-f : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
EcaHc-g : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
TtrHcA : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
AauHc6 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
CsaHc1 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
CsaHc2 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
CsaHc3 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
CsaHc4 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
CsaHc5 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
CsaHc6 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
HamHcA : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
PinHcB : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
PinHcC : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
PelHc1 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
PelHc2 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
PelHc3 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
PelHc4 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
CmaHc6 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
CsaHc : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
PvaHc1 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
PvaHc : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
PinHcC : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
SamHc : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
ScoHcA : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
ScoHcD : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
ScoHcX : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
ScoHcC : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
ScoHcB : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
SpiHc1 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297
AgiHc1 : TVPFAF-----FVKVDRKGELFYMHQOQVARYDIERLCLLPKVEKLEWRVPTPDGYFSKLVNNSGRPMGTRODITF : 297

```

```

PlePP0 : * 340 * 360 * 380 * 400
PlePP0 : LKFRNRNDAGLDFITSDMEIWRSLDAIHCYMLNRNGRVPSNVTTGKRGTDLGAFEDAQLSPNYLFYGDLLH : 377
MjaPP0 : PKGFRREIG-EEVITDLEIWRSLDAIHCYMLNRNGRVPSNVTTGKRGTDLGAFEDAQLSPNYLFYGDLLH : 377
PmoPP0 : PKGFRREIG-EEVITDLEIWRSLDAIHCYMLNRNGRVPSNVTTGKRGTDLGAFEDAQLSPNYLFYGDLLH : 377
TmoPP0 : KDLNREVQ-IKQVQLKRSSRIYATHCSSATDERGRKTEITEN-----GTDLGMEISS-ILSPNPTFYGDMLH : 377
BmoPP01 : LRDIDRPVQ-IRSVSELETWRDRFQATENMSMLPNGRQLPDEE-----GTDLVGLMESS-ILSPNPTFYGDMLH : 377
GmoPP0 : LRDIDRPVNE-IKIVFOLETWDRFQATENMSMLPNGRQLPDEE-----GTDLVGLMESS-ILSPNPTFYGDMLH : 377
SbuPP02 : LRDIDRPVNE-ED-SKLTAOLETWDRFQATENMSMLPNGRQLPDEE-----GTDLVGLMESS-ILSPNPTFYGDMLH : 377
EcaHc-a : MDVRE-----VVDMERWTERIEATLRRVISPTGSHYIPDEE-----CADILGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
LpoHcII : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
EcaHc-b : KDMRE-----VSVDLERSRERLDAINLGVYVDPNGLETPEDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
EcaHc-c : KDMRE-----VSVDLERSRERLDAINLGVYVDPNGLETPEDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
EcaHc-d : KDMRE-----VSVDLERSRERLDAINLGVYVDPNGLETPEDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
EcaHc-e : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
EcaHc-f : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
EcaHc-g : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
TtrHcA : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
AauHc6 : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
CsaHc1 : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
CsaHc2 : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
CsaHc3 : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
CsaHc4 : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
CsaHc5 : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
CsaHc6 : RDLDG-----ITISEVMRREIRDSTLGVYISEDGSHTKDEL-----GTDLGALIESS-YESKNHGYGGLH : 326
HamHcA : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
PinHcB : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
PinHcA : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
PelHc1 : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
PelHc2 : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
PelHc3 : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
PelHc4 : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
CmaHc6 : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
CsaHc : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
PvaHc1 : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
PvaHc : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
PinHcC : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
SamHc : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
ScoHcA : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
ScoHcD : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
ScoHcX : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
ScoHcB : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
SpiHc1 : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360
AgiHc1 : FEDVDG-----ARVDMIIIESRIRDAIAHGYITDNGHINIRND-----GTDLVGLIESS-VYSPNAQYGGGLH : 360

PlePP0 : * 420 * 440 * 460 * 480
PlePP0 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
MjaPP0 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
PmoPP0 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
TmoPP0 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
BmoPP01 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
GmoPP0 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
SbuPP02 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
EcaHc-a : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
LpoHcII : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
EcaHc-b : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
EcaHc-c : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
EcaHc-d : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
EcaHc-e : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
EcaHc-f : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
EcaHc-g : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
TtrHcA : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
AauHc6 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
CsaHc1 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
CsaHc2 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
CsaHc3 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
CsaHc4 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
CsaHc5 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
CsaHc6 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
HamHcA : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
PinHcB : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
PinHcA : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
PelHc1 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
PelHc2 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
PelHc3 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
PelHc4 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
CmaHc6 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
CsaHc : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
PvaHc1 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
PvaHc : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
PinHcC : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
SamHc : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
ScoHcA : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
ScoHcD : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
ScoHcX : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
ScoHcB : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
SpiHc1 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453
AgiHc1 : NTHVLLAFCHDNNSHREIGVGDSTARDPFYRHKFVDDIEFKLTPPYTIEDSLGVMIDKVGVR---- : 453

```

```

PlePP0 : -NDQLTIGSVREFASRLD NSP--NPVILRLTLDHAPVHLITN SHRKPSVTVRYTAPHNERLELG : 529
MjaPP0 : -NDEADLHIGMKRGFASRLD NG--RPVLEKLDHEPENHLQVLRGRTAEVTVRVFLAPFNARGLKNN : 517
PmoPP0 : -GNEADVLLIGMNTREFASRLD SGK---PVILRLTLDNKPVDHGTITNLRPEKEVTVRYTAPFGDREKEND : 517
TmoPP0 : -GGSAATLNTFVCSDMMSRMDQPR--GSVFRFTLQHQPSVKTITVKNSSNGNKGTGRIFTAPLDERGNPWL : 517
BmoPP01 : -GGTPNTLNTFVCSSTVLSGRMDTPR--GSVLAKFTLQHQDEVNVVETVGTSSVMGMFRIFTAPTVDSESKPFS : 518
GmoPP0 : --AGANRFATQWCSLVLSOGLDTPR--GSVLAKFTLQHEEFTVVEVNTSGQSMGTRVRFMAPTDERGQPLA : 517
SbuPP02 : QKATPNLLITLTYEKSDVLAAGLDGPK--GNTYATFTLQHAPEVTVDTNIDKKPKGTGRIFLQPNDERGTPLS : 522
EcaHc-a : ---IPNVVHTIRDELELSHCLHAKP--GSVRARYHLDHESVVIISANNSNADQRTVRIFLAPTYDELGNLS : 477
LpoHcII : ---VDNVVHTIRDELELSHCLHAKP--RSUKARYYLDHEPSVAVVNSASDHAIVRIFLAPTYDELGNLS : 476
EcaHc-b : ---TADVVEITPAALLDTSHAFNGRT--GPKVRYRHLDHPEVNVKVVVAGTKTKATVRIFLQPEHDMNGEFD : 474
EcaHc-c : ---EENVVITTEVDLLDTSHAFNGRT--GAKVRYRHLDHPEVNVDEVSNSARLHGGRIFLAPVHDELGNLT : 477
EcaHc-d : ---VPLNLTITSKSLLSHGINLK---GHVQVYHLDHEPNVETVNRTEAEFTGVRIFLAPTYDELGNRII : 471
EcaHc-e : ---VPLNLTITSKSLLSHGINLK---HSVLYLRHLDHPEVNVISVSSGGAQVTVRIFLQPYDELGNRIQ : 471
EcaHc-f : ---APVNVVHTIRDELELSHCLHAKP--GAKVRYRHLDHPEVNVISVNTIGDVHKTVRIFLQPTDELGNRII : 473
EcaHc-g : ---SONRVRLKLEELVLSHGINGTE--HTVKVYHHLDHPEVNVITVNSGAVHKTVRIFLQPTDELGNRII : 472
TtrHcA : VITARNVITLTKKNEELTHGIDGTT--NSVKVYRHLHEPEVNVITVNSGAKQTVRIFLAPTYDELGNRII : 471
AauHc6 : ---TANVTITLIKSLLSHGINGTD--QSVKVKYHLDHEPNVNVVNSGAEHSTVRIFLAPTYDELGNRII : 472
CsaHc1 : ---KTVNVITFMKDHLLSHGINGTE--HKVLYKYHLDHEPEVSLIITVNTISEIHAIVRIFLQPYDELGNRII : 472
CsaHc2 : ---QANVTITFMKDHLLSHGINGTG--HKVQVYHLDHEPEVSLIITVNTIGAAHAIVRIFLQPYDELGNRII : 472
CsaHc3 : ---QANVTITFMKDHLLSHGINGTG--HKVYKYHLDHEPEVSLIITVNTIGAAHAIVRIFLQPYDELGNRII : 472
CsaHc4 : ---QANVTITFMKDHLLSHGINGTG--QSVKVKYHLDHEPEVSLIITVNSGSAHAIVRIFLQPYDELGNRII : 472
CsaHc5 : ---QANVTITFMKDHLLSHGINGTG--HKVYKYHLDHEPEVSLIITVNSGTAHAIVRIFLQPYDELGNRII : 472
CsaHc6 : ---QANVTITFMKDHLLSHGINGTG--HRVYKYHLDHEPEVSLIITVNSGAAHAIVRIFLQPYDELGNRII : 472
HamHcA : -----LNTDFEFESLVNAVDELEKVDVAISAYVHRLNHEEVSUKILVNNNEGDLIVRIFLQPTVDDNNHITP : 510
PinHcB : -----LNTDFEFQYSLINAVDSGENIEDVDHARVHRLNHEEVSUKITVNSNDGEELATVRIFLQPTEDNNGITIT : 494
PinHcA : -----LNTDFEFQYSLINAVDSGENIEDVDHARVHRLNHEEVSUKITVNSNDGEELATVRIFLQPTEDNNGITIT : 494
PelHc1 : -----LNTDFEFKYSLVNAVDSGENIEDVDHARVHRLNHEEVSUKITVNSNDGEELATVRIFLQPTEDNNGITIT : 521
PelHc2 : -----LNTDFEFKYSLVNAVDSGENIEDVDHARVHRLNHEEVSUKITVNSNDGEELATVRIFLQPTEDNNGITIT : 521
PelHc3 : -----LNTDFEFKYSLVNAVDSGENIEDVDHARVHRLNHEEVSUKITVNSNDGEELATVRIFLQPTEDNNGITIT : 522
PelHc4 : -----LNTDFEFKYSLVNAVDSGENIEDVDHARVHRLNHEEVSUKITVNSNDGEELATVRIFLQPTEDNNGITIT : 522
CmaHc6 : -----LNTDFEFYSLVNAVDDTEVDVDDFTYVSRNLNHEEVSUGVAVNLHDHDLVTVRIFLQPTEDNNHVAFS : 493
CsaHc : -----LNTDFEFYSLVNAVDDTEVDVDDFTYVSRNLNHEEVSUGVAVNLHDHDLVTVRIFLQPTEDNNHVEFS : 517
PvaHc1 : -----LNTDFEFYSLVNAVDDTEQIADVDSTYVRLNHEEVSUKITVNSNDGEELATVRIFLQPTEDNNHVEFS : 511
PvaHc : -----LNTDFEFYSLVNAVDDAEGIPDVEISTYVRLNHEEVSUKITVNSNDGEELATVRIFLQPTEDNNHVEFS : 507
PinHcC : -----LNTDFEFYSLVNAVDDTEQIADVDSTYVRLNHEEVSUKITVNSNDGEELATVRIFLQPTEDNNHVEFS : 500
SamHc : -----LNTDFEFVDMVNLALDTEELPDVSIHARVRLNHEEVSUKITVNSNDGEELATVRIFLQPTEDNNHVEFS : 514
ScoHcA : DY--DDEVTYVNDNYLKGKEDTRK--TTATVYKVRLOHEDEVHETITNAGKAKKAVERTVIRFAPTYNEKELFP : 502
ScoHcD : TY--ENIVRTYVNSLFLAKFTTTE--GSVLYKVKLNHETITNAGKAKKAVERTVIRFAPTYNEKELFP : 502
ScoHcX : R--KNEITVYVNDNYLKGKEDTRK--SDAKVKVLOHEDEVHETITNAGKAKKAVERTVIRFAPTYNEKELFP : 519
ScoHcC : ETSARDTVYVNDNYLKGKEDTRK--TPAYVYKVKLOHEDEVHETITNAGKAKKAVERTVIRFAPTYNEKELFP : 512
ScoHcB : P--ANTVITVYVNDNYLKGKEDTRK--GHARVYVNDNYLKGKEDTRK--NAGGEHKKVVRVIRFAPTYNEKELFP : 506
SpiHc1 : E--ENIVRTYVNSLFLAKFTTTE--SEAKVYVNDNYLKGKEDTRK--NAGGEHKKVVRVIRFAPTYNEKELFP : 500
AgiHc1 : E--ENIVRTYVNSLFLAKFTTTE--SEAKVYVNDNYLKGKEDTRK--NAGGEHKKVVRVIRFAPTYNEKELFP : 500

PlePP0 : FMEIRLWAEEMDKTODLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 605
MjaPP0 : FMEIRLWAEEMDKTODLKGGH--VYVTSKSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 592
PmoPP0 : FMEIRLWAEEMDKTODLKGGH--VYVTSKSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 593
TmoPP0 : YRDKNVFEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 591
BmoPP01 : FEDRRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 593
GmoPP0 : FEDRRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 592
SbuPP02 : LNDRLWAEEMDKTODLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 597
EcaHc-a : DELRRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 548
LpoHcII : ADELRRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 547
EcaHc-b : IGRRLMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 544
EcaHc-c : PEELRRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 547
EcaHc-d : LEEORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 541
EcaHc-e : PEQORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 539
EcaHc-f : LNEORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 544
EcaHc-g : PNEORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 544
TtrHcA : ANLORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 541
AauHc6 : PDEORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 543
CsaHc1 : PDEORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 543
CsaHc2 : PDEORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 543
CsaHc3 : PDEORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 543
CsaHc4 : PDDORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 543
CsaHc5 : PDDORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 543
CsaHc6 : PDDORRMLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 543
HamHcA : LSEGHWTCLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 588
PinHcB : LDEARWFCLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 572
PinHcA : LDEARWFCLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 572
PelHc1 : LDEARWFCLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 599
PelHc2 : LDEARWFCLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 599
PelHc3 : LDEARWFCLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 600
PelHc4 : LDEARWFCLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 600
CmaHc6 : FNDGWNACLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 571
CsaHc : FNDGWNACLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 595
PvaHc1 : FDEGWNACLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 588
PvaHc : FDEGWNACLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 580
PinHcC : FNEGWNACLEMDKFKYKLGKESGK--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 578
SamHc : INEKHYRLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 592
ScoHcA : VNE-RHLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 568
ScoHcD : LND-RHLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 577
ScoHcX : LEEHVRWAEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 587
ScoHcC : IND-RHLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 578
ScoHcB : FNE-RHLEYEDKFTVNLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 572
SpiHc1 : LKEORVWAEEMDKTODLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 566
AgiHc1 : LKEORVWAEEMDKTODLKGGH--DVRASNLSSITVSGYITRSLEAVNPANPGPPA--AETNFGCGPELMLLPK : 566

```

```

PlePP0 : GKP*GMFYQLFVNLTDLEKQVYQAPG-PRR*AAASCGILSSFPD*RPMPGFPDRPPPPRLQDAEVTSLADYARL-S : 683
MjaPP0 : GRPGMAFQLFVNLTD*AIQKVTQPA--RS*PAGS*CGIQBAIYPTIRPMGFPDRPPPPMILNRPVDAADYARL-D : 669
PmoPP0 : GRPGMVFQLFVNLTD*AOQKXSNPGG-VRR*ANGS*CGMQBAIYPTIRPMGFPDRPPAPLLQGLPVNTTADYARL-G : 671
TmoPP0 : GTPGMPQQLFVMISSN*EDDKVNSTE--GV*EN*AGS*CGIKDKLYPD*ISMGYPRMPRN-----GVDTIQDFITS-- : 662
BmoPP01 : GTTGGYPMVLFVVMVSN*NDRRVEQDLV--GS*EN*AA*SGIRDRY*YD*RAMGFPDRPAPA-----ATTISDFIRP-- : 663
GmoPP0 : GTEGGYPMVLFVVMVSD*ADKLEQDTV--GA*EN*AA*SGILRRY*YD*RMHGFPDR*SE-----ARNLIDFKP-- : 661
SbuPP02 : GKPGMAFQLFVMISSN*VGDAVQNTNTPDIS*SS*SGGLDKLYPD*NTMGYPDR*L-----DARTIKDLTNAFS : 670
EcaHc-a : GNEKGMFDLFVNLTD*ASVDRVSGDGTPL*AAAS*CGVLDDY*YD*RAMGYPR*ITA-----DTHEEFTTG-- : 618
LpoHcII : GNIKSMYHLFVNLTD*MKDKVMSSES--VA*VLA*AS*CGARDHY*YD*KPMGFPDRPHT-----HTISDFITN-- : 616
EcaHc-b : GNEKGMKFLFVNLTD*AVQGVGDHGAT-GL*TTA*AS*CGAKDDL*YD*KPMGFPDRD*KA-----SIPWHP-- : 614
EcaHc-c : GNDKSMFHLFVNLTD*LYDLNGDYGYD-TP*VVA*AS*CGAKDSL*YD*RAMGFPDRPLPE-----GHASNLHQ-- : 617
EcaHc-d : GKERSMFLFVNLTD*DEKVGAGEQ-TI*SSA*AS*CGAKDDY*YD*KPMGFPDRPLV-----RTPSQFKTP-- : 611
EcaHc-e : GNHRSMFELFVIVTD*AQAANVGHEN-AE*VLA*AS*CGAKDDY*YD*KPMGFPDRVLEG-----LTIEEFTTP-- : 609
EcaHc-f : GTYKSMFOLFVNLTD*EDDHGSHNGQ-TL*AAAS*CGAKUSY*YD*RAMGFPDRVKA-----RTVADFRIT-- : 614
EcaHc-g : GTHRSMFOLFVNLTD*TVQNPCCGAGK-IV*AAAS*CGAKDDY*YD*KPMGFPDRPTKI-----TAEETTP-- : 614
TtrHcA : GNRKSMYFLFVNLTD*MKONVGGGG--F*SSA*AS*CGAKDDY*YD*KPMGFPDR*TEN-----EHLIDFTT-- : 609
AauHc6 : GSHKSMFELFVNLTD*HEDTLAGLSEN-AV*SSA*AS*CGARDY*YD*RAMGFPDR*LEA-----RTAAEFTP-- : 613
CsaHc1 : GTTKSI*FELFVNLTD*THDNP*GADVK-TI*GSA*AS*CGAKDDY*YD*KPMGFPDRPTTA-----RSAQELTD-- : 613
CsaHc2 : GTHKSM*FELFVNLTD*TLONP*GASVK-TI*SSA*AS*CGAKDDY*YD*KPMGFPDRPTVA-----RSAEELTE-- : 613
CsaHc3 : GTHKSM*YELFVNLTD*TDONP*GANVK-TT*AAAS*CGAKDDY*YD*KPMGFPDRP*SA-----RTAEELTE-- : 613
CsaHc4 : GTSKSM*FELFVNLTD*TVONP*GANVR-TI*SSA*AS*CGAKDDY*YD*KPMGFPDRHLTA-----RTAEELTD-- : 613
CsaHc5 : GTHKSM*FOLFVNLTD*TKONP*GASVK-TI*SSA*AS*CGAKDDY*YD*KPMGFPDRPTTA-----RTAEELTD-- : 613
CsaHc6 : GTHKSM*YELFVNLTD*TKONP*GANVQ-TI*SSA*AS*CGAKDDY*YD*KPMGFPDRHLTA-----RNEAELTD-- : 613
HamHcA : GTVGSMFDLFVNLTD*EDDKVTDHPET-DEHGGTH*Q*CGVHGE*YD*KPMGFPDR*STPD-----ERVFDV-A-- : 657
PinHcB : SKPGSMKFLNLVVA*TDGKKDT-EGHNGG-HDYGGTH*Q*CGVHGE*YD*NRPLGYLER*TPD-----ERVIDG-S-- : 640
PinHcA : SKPGSMFNLVVA*TDGKKDT-EGHNGG-HDYGGTH*Q*CGVHGE*YD*NRPLGYLER*TPD-----ERVIDG-S-- : 640
PeIHc1 : SKPGSMFNLVVA*TDGKKDT-EGSDGD-HDHHGTH*Q*CGIHGE*YD*NRPLGYLER*TPD-----ERVFDG-S-- : 667
PeIHc2 : SKPGSMFNLVVA*TDGKKDT-EGSDGD-HDHHGTH*Q*CGIHGE*YD*NRPLGYLER*TPD-----ERVFDG-S-- : 667
PeIHc3 : SKPGSMFNLVVA*TDGKKDT-EGSDGD-HDHHGTH*Q*CGIHGE*YD*NRPLGYLER*TPD-----ERVFDG-S-- : 668
PeIHc4 : SKPGSMFNLVVA*TDGKKDT-EGSDGD-HDHHGTH*Q*CGIHGE*YD*NRPLGYLER*TPD-----ERVFDG-S-- : 668
CmaHc6 : GNVKSLMDVNLVA*TDGGAADAAVE--G-LHENTSFNHYGCP*GT*YD*RP*GYPLDR*VDD-----ERVIND-H-- : 637
CsaHc : GKTSMFHVVF*TDGGAADAAVD--G-LHENTYNHYGCH*GT*YD*NRPH*GYPLDR*VDD-----ERVITG-S-- : 661
PvaHc1 : GNEGSLFDLVVA*TDGAADAAVD--G-LHENTEFNHYG*HG-V*YD*RP*GYPLDR*VDD-----ERVIED-P-- : 653
PvaHc : GNDKSLFDLVVA*TDGAADSAVP--N-LHENTYNHYG*HG-V*YD*RP*GYPLDR*VDD-----ERVIED-P-- : 645
PinHcC : GQAGSMFNLVVA*TDGRDAAALD--D-LHENTKFHYGYDR-Q*YD*RP*GYPLDR*VDD-----ERVFEAL-P-- : 643
SamHc : GRRSGMFFILFVNLTD*EKDVLDLPFD-YDYGGS-S*CGILGH*YD*AKPMGFPDR*IDQ-----GSFFT--K-- : 659
ScoHcA : GKYGMFYQLFVNLTD*EEDHVEDAGEE-CO*RRIS*SGSVEHL*YD*DKPLGYPR*DR*IDG-----TGFEF*FKTQ-- : 638
ScoHcD : GKYGLRFRVEAIVT*HEDDKVSD-QET-CL*GAA*CGAHNO*YD*KPMGFPDR*IDE-----RTFENFHTP-- : 646
ScoHcX : GSSGTPFAFVNLTD*EDDFTPNMDDT-CF*AA*SS*SGSLFI*YD*PENVMGFP*Q*ITIEC-----TKEEFFALP-- : 657
ScoHcC : GNFGFPMFVFI*YD*EEDKVEGPDEG-CALH*ALT*CGGIYH*YD*RAMGFPDR*PIKO-----RNFNAFKTK-- : 648
ScoHcB : GNHGV*FN*VYVIA*YD*EEDHVE-SD*ES-CH*G*SS*CGILYH*YD*RP*MGYPDR*HADA-----TTFD*FKTK-- : 641
SpiHc1 : GDYGM*YELFVNLTD*EEDKADTDL*CKL--A*HS*CGNILGE*YD*RL*GYPR*DR*TKA-----TGWAE*FKTQ-- : 635
AgIHc1 : GDYGM*YELFVNLTD*EEDKADNADM*CKL--A*HS*CGNILGE*YD*RL*GYPR*DR*TKA-----AGWE*FKTQ-- : 635

```

```

PlePP0 : NMTVQDIT*H*LLTASRSRHDGPI*---- : 707
MjaPP0 : NAFIHDIT*H*KLAD*ELKLN----- : 688
PmoPP0 : NAFMHDIT*H*KLGE--KLN----- : 688
TmoPP0 : NMTVQDIT*H*KNTRVVRPKSRN*---- : 684
BmoPP01 : NMAVRDCIV*H*TDRTQRQGG*---- : 685
GmoPP0 : NMTATRDCT*H*TD*AIREGTQRQ---- : 683
SbuPP02 : NMSMTDIT*H*NDV*IIDRKKN*---- : 691
EcaHc-a : NMTSHVIT*H*V*QD----- : 631
LpoHcII : NMTFKDIT*H*KEHE----- : 629
EcaHc-b : NMTFSEVIT*H*THHQ----- : 627
EcaHc-c : NMTSEVIT*H*THH----- : 629
EcaHc-d : NMTAFQETIT*H*VEGHKKH----- : 627
EcaHc-e : NMTSDVIT*H*V*TDIK----- : 624
EcaHc-f : NMTSEVIT*H*V*QDQV----- : 629
EcaHc-g : NMTSLDVIT*H*V*VHGE----- : 629
TtrHcA : NMTVSDIT*H*V*VHGE----- : 622
AauHc6 : NMTSLDVIT*H*V*VHGE----- : 626
CsaHc1 : NMTSLDVIT*H*V*VHGE----- : 634
CsaHc2 : NMTSLDVIT*H*V*VHGE----- : 626
CsaHc3 : NMTSLDVIT*H*V*VHGE----- : 626
CsaHc4 : NMTSLDVIT*H*V*VHGE----- : 626
CsaHc5 : NMTSLDVIT*H*V*VHGE----- : 626
CsaHc6 : NMTSLDVIT*H*V*VHGE----- : 626
HamHcA : NMTVSHVIT*H*V*V*KEEH*---- : 672
PinHcB : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
PinHcA : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
PeIHc1 : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
PeIHc2 : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
PeIHc3 : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
PeIHc4 : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
CmaHc6 : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
CsaHc : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
PvaHc1 : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
PvaHc : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
PinHcC : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
SamHc : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
ScoHcA : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
ScoHcD : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
ScoHcX : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
ScoHcC : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
ScoHcB : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
SpiHc1 : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657
AgIHc1 : NMTKHVVIT*H*V*VHLEHHD----- : 657

```

**Alignment 1:** Für die Neighbor-joining und Bayes Stammbäume der Myriapoda verwendete Sequenzen.

```

*      20      *      40      *      60      *      80
PlePP0  MQVTQKLRRDTEMADAQKQLLYLFRPYDIPNAPADGGSFYVAGA---DT----VA--TRFGVAPTSTVTPARPD 70
MjaPP0  -----MNIQQQLLYLFELPQEPNRPKGGSVLFVEND---DT--PPVVT--TRIAGSPSIKLQVPERND 60
PmoPP0  -----MANDQRLLYLFELPQEDIQAPRGGGSVLFKESD---EA--PPSVA--TRVGVSPPSNLPVPERKD 60
TmoPP0  -----MASKKNIL-LLFDRPREPVFIAGGSKKAVFSVPNEYLADKYKPLGVALTNRFGEADADERIDVKKIS- 65
BmoPP01 -----MSDAKNLLFFDRPSEPCFMQGEENAVFEIPDNYYPEKYQVRSNAIGNRFGSDAGRMIPIRNIA- 66
GmoPP0  -----MSDSKSRLLFFDRPSEPCFLQGDNDVAFEPDHYYSDDKYKSLTNTLANRFGSGEVRTIPVKNIA- 66
SbuPP02 -----MSKETNKIALALLFDRPLEPVFTADDDGKAVFDPESSYNEQYVDVDEITRFSSEDVDIKIPLRDLKQ 69
LpoHcII -----MT-LHDKQIRICHLEFQLSSATVIGDGKHKHS- 32
EcaHcA  -----MTI-LHDKQVOALKEFKLSVAATGEPVPADII- 33
NinHcA  -----MSL-LHEKQVYVLEFKERLSVAASGEKVPADII- 33
LpoHcV/VI -----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 34
EcaHcB  -----MPS-TAEKQKRTLPFFFTLSTKDKFGILLVRR- 33
NinHcB  -----SS-ASEKQKRVLPDQYWFSTKDKFGMRVRR- 33
EcaHcC  -----MPSDANEMARLLQFQHSILSTKAKFGLRVIR- 34
EcaHcD  -----MT-LADHQAALIPLEKKLT-SLSPDPPEAER- 31
NinHcD  -----MS-VADKQAQIIPLEKNLT-ALAPETLPEAER- 31
LpoHcIV -----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 34
EcaHcE  -----MP-DNOKQLRVSLFEHMT-SINT-PIPRDII- 30
NinHcE  -----MS-VKEKQORVCSLTHLT-SISRTAPLADRO- 31
LpoHcI  -----XXXXXXXXXXXX-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 33
EcaHcF  -----MT-WODKQRTLPLEHLT-SLTRGGDRTES- 31
NinHcF  -----MP-AQDKQRTLPLEHLA-SLTRAVLPPEER- 31
EcaHcG  -----MAS-TPEKQALIPLEKLT-SLKETPPRAAD- 32
NinHcG  -----MS-TKEKQDQIIPLEKLT-TLTRQTPPEER- 31
TtrHcA  -----T-TKEKQASTGALFEHLTSVPK-QHPEKER- 30
AauHc6  -----T-VADKQALMPLEKHLTALTREKLPDORDE- 31
CsaHc1  -----MA-TRDNVEKLPLEKLTSLTK-QQAPDOR- 31
CsaHc2  -----MT-TKEADRLGALFQLTSLTK-RQPVDDR- 31
CsaHc3  -----MT-VKENYDRIPLEKLTSLTR-LQPVDDR- 31
CsaHc4  -----MT-TKEADRLIPLENTLSLTR-HQPVDDR- 31
CsaHc5  -----MT-VKEADRLIPLEQLTLTR-HQPVDDR- 31
CsaHc6  -----MT-TKEADRLIPLENTLSLTR-QQPVDDR- 31

*      100      *      120      *      140      *      160
PlePP0  ADRLIGRAPSVPRGAVFSFIRSHREARDCDVIMKTONSTDLVQLASVHRVNELEFYASFTILRKQELRGVRL 150
MjaPP0  VALQDGGTATSTIISASFFLASRRRAKDCDFMKTSGAKLMEVAVRHGVNSELFYASFTILRKQELQSVRL 140
PmoPP0  VTLODGGTATSVKGSASFASIRRAKDCDFMKTSGAEDLQVAVRHGVNSELFYASFTILRKQELRSVRL 140
TmoPP0  --IPFGEILESDENSLIPKRRIRAGRIDFLGMRVVDLVSIVYRIRVNPYLFNYASVAILHRPDIQDVL 143
BmoPP01 --LNDLPMELGYNEQSLVVKRKLAGRIDFMGMRVVDLQVCSYQCLINPYMENYCSVAILHRPDIKGLT 144
GmoPP0  --LNDLPLQLGYNDQSLVAKRRMAGRIDFINMRVVDLQVCSYCOMRVNPYMENYCSVAILHRPDIKGLQV 144
SbuPP02 --KDISFTRPLGRKQSLNNIRREIARIDFMSTPTEELDATCAYCKIRVNPFLFOYCSVATQHRKQTSDFPV 147
LpoHcII -----DKKNVGLQPALESPMPDIEARHLYEVFEAGIDFDEIATKEATTFVNELEFAVAEAVLHRDQKGLV 109
EcaHcA  -----EELRNITLGPNEFSFYPPDIEAKRVYEFCHAANGEDVSLAKQSFNMSTLFAEAVALLHREDRGV 110
NinHcA  -----AQLSTGELINSASFSLPAPAEAKRITLFLSKKQEDVYLLAEQATFVNSTLFAEAVAILHRDSRGIV 110
LpoHcV/VI -----XXXXXXXXXXXXXXXXXFAEHLAAATKVEVITCKTTEEDICHQRFVNELEFYASVAILHRPDQGV 111
EcaHcB  -----PRACGVLCRVVFSFEEHKAATQVEVIECESFEEDICHQRFVNELEFYASVAILHRPDQGV 110
NinHcB  -----PRSGGLVLRGVVFSFEEHKAATQVEVITPTFEEDICHQRFVNELEFYASVAILHRPDQGV 110
EcaHcC  -----PRAGTGLRGKVFSSFEEHKAASRAEVVGAETFEEDICHQRFVNELEFYASVAILHRPDQGL 111
EcaHcD  -----PRKGVGLRGRTFSSFEEHKAETLAALVEAKNFIDJALATNRAVNELEFYASVAILSRDNGV 108
NinHcD  -----PRKGVGLRGRTFSSFEEHKAQALYEVVEAKDFSDINLAKQREIVNELEFAEASVTVLHRDQGV 108
LpoHcIV -----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 111
EcaHcE  -----ARTHHLRLQBELFSSFEEDIEATELYKLTAKDFEVINLAKSRTFVNELEFYASVALLHRDQK 107
EcaHcF  -----PRHGLGLAQBELFSSFEKGLEAATKLYETLNAAKDFEDINLAKQSFANELEFYASVAILHRDQ 108
NinHcF  -----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXFDLHLLERATVNECMFYATVAVLHRDQ 110
LpoHcI  -----VLRVRRLRGRTFSSFSEHKAATELYQIVKADSFADTHLQOARIVNELEFYASVAILHRDQ 108
EcaHcF  -----PRKRLRLRGRTFSSFTEHLLAEELFETLNAAKDFEDMRLAEQARIVNECMFYASVAILHRDQ 108
EcaHcG  -----PRAGVGLRGRTFSSFEKHLLEATKLKLVSAESFNDLQALAREARIVNELEFYASVAVIHRDQ 109
NinHcG  -----PRIGVGLRGRTFSSFERHKLATKLFEVYKAADFADLNLAKQARIVNELEFYASVAVVHRDQ 108
TtrHcA  -----NRDHDVHLSRGKFSFIRREIEAHLVEYHAANKFDDLLCKQARIVNECMFYASVALLHRDQ 107
AauHc6  -----PRKGVGLRGRTFSSFEHKAATELVALLGAKDFEDTHLCEARQIVNECMFYASVAVLHRDQ 108
CsaHc1  -----PRASVGLRGRTFSSFEHKNATELKTIRANDFDDLKTQARIVNELEFYASVAVHRDQKGL 108
CsaHc2  -----PRIAEGRRLRGRTFSSFEHKAATELVLYSANDFDDKLATORIVNELEFYASVAVVHRDQ 108
CsaHc3  -----PRIAEGRRLRGRTFSSFEHKAATELVLYSANDFDDKLATORIVNELEFYASVAVVHRDQ 108
CsaHc4  -----PRADAGHLRGRTFSSFEHKAATELVLYGANDFDDKLATORIVNELEFYASVAVVHRDQ 108
CsaHc5  -----PRIVHAGRLRGRTFSSFEHKAATELVLYAAKDFDDKLATORIVNELEFYASVAVVHRDQ 108
CsaHc6  -----PRIAHAGHLRGRTFSSFEHKAATELVLYAANDFDDVHLATORIVNELEFYASVAVVHRDQ 108

```

```

PlePP0      *      180      *      200      *      220      *      240
PlePP0      PPILEVFPHKFIPEDTSMQVGVNRT-PTATTPLVIEYGPVFANTNQAHRVSYWREDVGINSHHWHLVYPIEM- 228
MjaPP0      PSFVEVFPSSRFVPOETLAKAQIRINRM-DNQREPVIIEHGLEFSGTHLKEPHRLSYWREDVGLSVHHWHLIYVPGM- 218
PmoPP0      PTMVEVFPSSRFVPOETLAKAQLQINRM-DNQTEPVIEHGPFSGTHLKEPHRLSYWREDVGINSHHWHLIYVPAM- 218
TmoPP0      PSFIESFPDKYVDAKVFAQAREQATVV-PEGSRAPTEI--PKDYIASDLEEHRLAYFREDIGINLHHWHLVYVFEAA- 220
BmoPP01     PTFAESFPDKFDPKVFROAREVSSVV-PSGARMPITVI--PSNYIASDTEPEQRYAVFREDIGINLHHWHLVYVFDAA- 221
GmoPP0      PPVIEIFPDKFPDPKVFRAARETTTVN-ASGNRMPITTI--PTNYIASNSEPEQRYAVFREDIGINLHHWHLVYVFEAA- 221
SbuPP02     KPFAEITFQNFTEPAVFKAARAGEVVPNMGDRRHITET--PRNYIASDREEQRLGYFREDIGINSHHWHLVYVNGNP- 225
LpoHCII     PPVQIEIFPDKFIPTSAATNEAFKAHVRFPEFDESPILV--DQDTGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVSTIN- 186
EcaHCa      PPVQIEVFPDRFIPADSLIKAFTLATTI-QGDESDIIV--DQDTGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVSTVD- 187
NinHCa      PPIQIEIFADRFVPAADTLIRAFSVATTK-PAGDESDVII--DQDTGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVSVVD- 187
LpoHCV/VI   PPIQIEIFPDKFPVITOTLYDAFKEFWQN-PHKEE-DIVV--DQDTGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTIR- 187
EcaHCb      PPVQIEVFPDKFVPSETTLKAFKEVRL--HODEE-EIIV--DQDTGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTIR- 185
NinHCb      PPIQIEIFPDKFPVETLYEAYKETKL--HKEDE-DVII--DQDTGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTIR- 185
EcaHCc      PPIQIEIFPDKFPVETLYEAYKETKL--HKEDE-DVII--DQDTGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTIR- 185
EcaHCd      PPIQIEVFPDRFVPAETINRLAVDKVS-DINK--DTVV--PQDTGILQPEKRAYYREDVGINSHHWHLVYVPTVD- 183
NinHCd      PPIQIEVFPDKFIPAEITINRLADKK--STDE--SKVI--EIQDTGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTIR- 182
LpoHCIV     XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX- 189
EcaHCe      PPIQIEIFPDKFPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
NinHCe      PPIQIEIFPDKFPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
LpoHCi      PPIQIEVFPDRFIPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
EcaHCf      PPIQIEIFPDKFPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
NinHCf      PPIQIEIFPDKFPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
EcaHCg      PPIQIEVFPDRFIPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
NinHCg      PPIQIEVFPDRFIPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
TtrHCa      PPIQIEVFPDRFIPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
AauHC6      PPIQIEVFPDRFIPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
CsaHC1      PPIQIEVFPDRFIPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
CsaHC2      PPIQIEVFPDRFIPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
CsaHC3      PPIQIEVFPDRFIPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
CsaHC4      PPIQIEVFPDRFIPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
CsaHC5      PPIQIEVFPDRFIPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181
CsaHC6      PPIQIEVFPDRFIPVETTLINLAKAAN--HDDQ--DTSV--HVEITGILQPEKRAYYREDVGINHHWHLVYVPTVD- 181

PlePP0      *      260      *      280      *      300      *      320
PlePP0      ---NVNDRDKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 304
MjaPP0      ---VDRDRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 294
PmoPP0      ---FDRDRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 294
TmoPP0      RE--VVAKNRRGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 298
BmoPP01     DRA-IVNKDRRGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 300
GmoPP0      -RE-IVNKDRRGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 299
SbuPP02     IE--VVVKDRRGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 302
LpoHCII     PKYFSGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 264
EcaHCa      PAFFSGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 265
NinHCa      SKFFSGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 265
LpoHCV/VI   PEVTHGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 265
EcaHCb      PEVTHGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 263
NinHCb      PEVTHGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 263
EcaHCc      SVKMHMRDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 265
EcaHCd      ADLFGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 261
NinHCd      PDFFSGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 260
LpoHCIV     XXXXXXXXXXXXGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 267
EcaHCe      PAFMGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 259
NinHCe      PEVTHGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 260
LpoHCi      PEVTHGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 262
EcaHCf      ASVMSKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 263
NinHCf      PEVTHGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 262
EcaHCg      AVFTGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 261
NinHCg      VEITGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 260
TtrHCa      SEVTHGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 258
AauHC6      PTMTHGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 260
CsaHC1      ESITGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 260
CsaHC2      EGTGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 260
CsaHC3      EGTGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 260
CsaHC4      EELTGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 260
CsaHC5      EELTGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 260
CsaHC6      EELTHGKDKRRKGELFYMHQOQIARYDMLERLSVNLVVEKLEVRVPIPDGYFSKLANNSGRPVGRDNTFLQFRRN- 260

```





```

*      660      *      680      *      700      *      720
PlePP0 TDLEKDDQDPAGPR-R-CAVAVSFCGLDSKFPDKR-MGFPFDRPPPRQLQDAEVT-SVAD-ARL-SNMTQITITLTT 697
MjaPP0 TDYAIKKTTPAA-R-SCPNVSVFCGIQDAKYPDT-MGFPFDRPPPMILNRPVEDAAD-ARL-DNAFHISTGLAD 683
PmoPP0 TDYAAQKSNPGGVR-R-CANGVSFCGMQDAKYPDA-MGFPFDRPPAPLLQGLPVNTAD-ARL-GNAFHITITLGLGE 685
TmoPP0 SNYEDDKVQSTE-G-ICNDAGSYCGIKDKLYPDRRS-MGFPFDRMPRNG-----VDTLQQLFIS--NMRVQVITITNTR 676
BmoPP01 SNMNDNRVEQDLV-G-SCNDAAASYCGLRDRKYPDKR-MGFPFDRPAPAA-----TILSDFLRP--NMAIRDCIVETDR 677
GmoPP0 SDYNADKKEQDTV-G-ACNDAAASYCGLRDRKYPDKR-MGFPFDRSE-----RNLTDELKP--NMATRCITITETDA 675
SbuPP02 SDYVGDVAQQTNNTPD-CSDSSSFCGLDKLYPDNR-MGYPFDRRLDA-----RILKDLTNAFSNMSTITITENDV 684
LpoHcII TDMDKDKVDSSES-V-ACVDVASYCG-RDKYPDKK-MGFPFDRPHT-----EHISDFLTN--NMFKDKITGHE- 629
EcaHcA TDASVDRY-QSGDGTPT-CADALSYCGVLD-KYPDKRAMGYPFDRITTA-----DTHIEFLTG--NMNISHVITVEOD- 631
NinHcA TDAEKDKVPTSGKK--CNDALSYCGVMD-KYPDKRAMGYPFDRITTA-----QSHIEFLTP--NMKISHVITVEOD- 630
LpoHcV/VI TDALHDDGDHKGKTG-CIDVASYCG-KDLYPDRR-MGFPFDRITEL-----EHLKDWLP--NMKDLITITTHHEE 632
EcaHcB TDVAVGGLGDHGATG-CIDVASYCG-KDLYPDRR-MGFPFDRITKA-----DIPFELHP--NMHFEVITTHHQ- 627
NinHcB TMYFEETINDHGRTN-ECVDVASYCG-KDLYPDKRAMGFPWDREVA-----NDFNEHROP--NMISIPDQVHS- 628
EcaHcC TDYLYDLGDYGYDT-PCVDVASYCG-KDSLYPDRRAMGFPFDRITPE-----GHASNLHOP--NVSFQIKIQHH-- 629
EcaHcD TDYEEKVKVDSAGEQT-CSDVASYCG-KDKYPDKKAMGYPFDRITQV-----RTPSDKKP--NMAFQELITQVEGH 625
NinHcD TDYVEDKLLDSDATV-CSDVASYCG-KDKYPDRRAMGYPFDRITKA-----RTPSDEKLO--NMSTFVRDQGGY 625
LpoHcIV XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-XXXXXXXX-XXXXXXXXXXXXXX 635
EcaHcE TDYAADAVNGHGENA-ECVDVASYCG-KDKYPDKK-MGFPFDRILEG-----LLEEFLLP--NMSCITVRIYTDI 623
NinHcE TDYEQDAVGEA-SG-CVDIAISYCG-KDKYPDKK-MGFPFDRITTA-----DTVAEFLTP--NMSCITVKIKHVI- 625
LpoHcI TDYEHDDVGGKGSNDNH-CDDVASYCG-KDSKYPDKK-MGFPFDRITDAH-----DIEEFLTPN--MALITVKIKREG- 629
EcaHcF TDYEDDHVGSNNGQT-CADVASYCG-KDSKYPDKRAMGFPFDRITKA-----RTVADRTIT--NMSTITVKIKKQDQ 628
NinHcF TDYEHDDHNLNEKS-CADVASYCG-KDKYPDKKS-MGFPFDRITKA-----RTLAEESSA--NMKFQEVKIQEKE- 626
EcaHcG TDYITVDNPGGAGKI-CADVASYCG-KDKYPDKK-MGFPFDRITKI-----HTAEELTP--NMSTITVITQVGH 628
NinHcG TDYSEDNPEANVKT-CNDVASYCG-KDKYPDKK-MGFPFDRITLS-----SVAAKLITE--NTCITVITIKELG- 626
TtrHcA TDYQKDNVGGGG--FCSDVASYCG-KDKYPDKK-MGFPFDRITEN-----EHLEDFLT--NMGVSDIKIQFMG- 622
AauHc6 TDHDEDTIAGLSENA-CSDVASYCG-RDYPDKKAMGFPFDRITTA-----RTAAEFLTP--NMSTITIKIQFMG- 626
CsaHc1 TDYTHDNPEADVKT-CGDVASYCG-KDKYPDKK-MGYPFDRITTA-----RBAEFLLD--NMSTITVKIQVLYG 627
CsaHc2 TDYTLNPEASVKT-CSDVASYCG-KDKYPDKK-MGFPFDRITVA-----RTAEELITE--NMSTITVKIQVLYG 626
CsaHc3 TDYTDNPDANVKT-TCADVASYCG-KDKYPDKK-MGFPFDRITVA-----RTAEELITE--NMSTITVKIQVLYG 626
CsaHc4 TDYTVNPEANVRT-CSDVASYCG-KDKYPDKK-MGFPFDRITTA-----RTAEELLD--NMATITVKIQVLYG 626
CsaHc5 TDYTKNPEASVKT-CSDVASYCG-KDKYPDKK-MGFPFDRITTA-----RTAEELLD--NMSTITVKIQVLYG 626
CsaHc6 TDYTKNPDANVQT-CSDVASYCG-KDKYPDKK-MGYPFDRITTA-----RNEAELLD--NMVITVITVLYG- 626

*
PlePP0 ASRSRHGDI 707
MjaPP0 ELKLN-----688
PmoPP0 --KLN-----688
TmoPP0 TVRPKSRN---684
BmoPP01 TRRGQQG---685
GmoPP0 IREGTORQ---683
SbuPP02 IIDRKKN*---691
LpoHcII -----
EcaHcA -----
NinHcA -----
LpoHcV/VI VHNHNN-----638
EcaHcB -----
NinHcB -----
EcaHcC -----
EcaHcD KH-----627
NinHcD KA-----627
LpoHcIV XX-----637
EcaHcE K-----624
NinHcE -----
LpoHcI -----
EcaHcF V-----629
NinHcF -----
EcaHcG E-----629
NinHcG -----
TtrHcA -----
AauHc6 -----
CsaHc1 KRACYGN----634
CsaHc2 -----
CsaHc3 -----
CsaHc4 -----
CsaHc5 -----
CsaHc6 -----

```

**Alignment 2: Für die Neighbor-joining und Bayes-Stammbäume der Cheliceraten verwendete Sequenzen.**



```

NinHc-a : AMTDLRLV-VYQDMQRWTRILEATHLGVVLEGNDDITLADLQGLGIESLSEKRFYGLNHNWGHVMAIYTH : 337
NinHc-b : KLADLE-CAVQDMERWRRLQSINLGVVWVHPHGLDLEADLQGLGIESVSYVFPYGLNHNWGHVMAIAAH : 335
NinHc-d : TLRLTIRE-VYQDMQRWRRRLSLATHGVQVLTNGQVPLDLRLGLDGLAISSQSEVLKGYGYTLHNWGHVMAIYTH : 332
NinHc-e : RLRLDKD-VYQDMQRWTRILEALDLGFVEISEHQQHKTENGLDGLGIESVSEYSEKRLFYGLNHNWGHVMAIANIT : 336
NinHc-f : SLHLDDT-VYQDMQRWRRRLLEATHLGVLTDHGNEVITPHEPDLMLGLSLESSSEYSEKRYGGLNHNWGHVMAIYTH : 334
NinHc-g : SLRLDTE-VYQDMQRWRRRLDALTDLKHWLDSKGVNEVITPHEPDLMLGLSLESSSEYSEKRYGGLNHNWGHVMAIYTH : 334
PleHc : EFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 368
PleHc2 : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 368
HamHcA : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 371
PleHcB : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 371
PleHcC : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 371
PleHcD : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 371
PleHcE : RFKVVDD-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 383
PleHcF : RFKVVDD-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 383
PleHcG : RFKVVDD-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 383
PleHcH : RFKVVDD-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 383
CmaHcA : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 384
GroHc : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 384
CsaHc : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 378
PvaHc1 : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 378
PvaHc2 : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 378
PleHcC : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 378
PleHcD : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 378
PleHcE : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 378
PleHcF : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 378
PleHcG : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 378
PleHcH : RFEDDV-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 378
CmaCcl : RLDDVDD-VYRQDMLLESTRIDATLHGVIYNHSGNKDQKNEHGIDTLDGLDIESSVSPVPIYGAALNHTHVLG : 357

```

[illegible]

```

NinHc-a : E L T H C M N F G S P ----- G S V K A R Y H L D H S S V I F A N N ----- N G S E E K G T V R I F A P K Y D E L G N V I P I D E O R R L Y I E L D : 489
NinHc-b : D Y S H A F Y F G R T ----- G S K V K R Y H L D H S P T Y Q V F E N ----- T G T K T H A K V R I Y G P K N D L G N P T K I S I R R L M I E L D : 487
NinHc-d : E L S H G I N L K T ----- N K I K V K Y H L D H S P S Y T I A A T N ----- A T G A A K I T V R I F A P K Y D E L G N R L V I E D O R R L Y I E L D : 482
NinHc-e : E L T H G I D F G T T ----- K S K V K Y H L D H S P T F N T S M O N ----- S G G A K A T V R I F A P K Y D E L G N R L D P E I O R T L C I E L D : 484
NinHc-f : E V S H G S L K ----- G S K V K Y H L D H S P F A Y N T S C E N ----- S S G A T H A T V R I F A P V F D E L G N K L S I N E A R F F I E L D : 484
NinHc-g : T L S H G I N F G T I ----- R K V K V Y H L D H S P S I T V A O N ----- S S G A P H A T V R V F A P K F D E L G N R L S P D E O R P L F I E L D : 484
PleHc : D L S W L D T T E N V ----- N E S Y K T H I S R L N K P F S L N I A H A ----- E H D D K V T V R V Y I S A K H D E N T A L D D E S R W G A T I E L D : 516
PleHc2 : S L V A V D Q S D K V ----- A D V A S A D V R L N H O E S Y N I A V S N ----- N N G G K V I G T I R I F I C P V K S N G Y I F T W E G H W H C I E M D : 535
HamHcA : S L G N A V D E L E K V ----- H D V A S A V Y R L N H E E S Y K I L I V O N ----- N N G G I I A T V R I Y I C P T V O N N H I H P I S E G H W C I E M D : 522
PinHcB : S L I N A V D S S G E N I ----- E D V D I N A R V R L N H E E T Y K I T V S N ----- N N D G E R L A T E R I F I C P I E D N N G I T I T D E A R W F C I E L D : 586
PinHcA : S L I N A V D S S G E N I ----- E D V D I N A R V R L N H E E T Y K I T V S N ----- N N D G E R L A T E R I F I C P I E D N N G I T I T D E A R W F C I E L D : 586
PleHc1 : S L V A V D S S G E N V ----- E D W A I Y A N V R L N H E E T Y V I S V S N ----- H N E E K F A T V R I F I C P T E D N N G I T I N D E A R W L C I E L D : 533
PleHc2 : S L V A V D S S G E N I ----- E D W A I Y A N V R L N H E E T Y V I S V S N ----- H N E E K F A T V R I F I C P T E D N N G I T I N D E A R W L C I E L D : 533
PleHc3 : S L V A V D S S G E N V ----- E D W A I Y A N V R L N H E E T Y V I S V S N ----- H N E E K F A T V R I F I C P T E D N N G I T I N D E A R W L C I E L D : 534
PleHc4 : S L V A V D S S G E N V ----- E D W A I Y A N V R L N H E E T Y V I S V S N ----- H N E E K F A T V R I F I C P T E D N N G I T I N D E A R W L C I E L D : 534
CmaHc6 : S L V A V D D T E D V ----- D D V D I T Y I S R L N K E S H V G I V I L ----- E L D H D V A T V R I F A M P H E D N N G I A F S F N D G R W N A T E M D : 595
GroHc : D L K M A V D S S E A I ----- A E V E V K A H V R L N K O F A Y N F I K S D S A I C H A V R V R V L C P R R O N N G I Q F T R D E G R W N C I E M D : 528
CsaHc : S L I N G V D D T V D V ----- L D V P I S T V S R I F N O K V K T I G I T N ----- S O N H E V A T V R I F A M P K Y O N N H E F S F N D G R W N A T E L A : 529
PvaHc1 : N L I N V D D T E O I ----- A D V E I S T V P R L N H K E K I K V A S N ----- N K G E E S Y R H I F A M P L O N N G I K F T R D E G R W N A T E L D : 523
PvaHc : S L I N V D D A E G I ----- P D V E I S T V P R L N H K E T F R I V E N ----- G G A E R L A T V R I F A M P H K O N N G I E Y T F D E G R W N A T E L D : 519
PinHcC : S L I N V D D T V O I ----- A D V E I L T Y I R L N H K K F L I T I T N ----- N N N T E V A T V R I F A M P L R O N N G I E Y S F N D G R W R A L E L D : 512
HamPhc1 : S L V A M D D K E E M K W E D N E I S A I T P R L R K O F S K V I W N ----- N N D E N K L A T I R I F A M P H R O V N G I I P F N E G R W H A T E L D : 533
HamPhc2 : S L V A M D D K E E M I W E D S E I S A I T P R L R K O F S K V I W N ----- N N D E N K L S T I R I F A M P H R O V N G I I P F N E G R W H A T E L D : 531
CmaCc1 : D L I N G L N D T T E T - E - F Y G I Y A T M P R L N K E S Y K I L I V O N ----- N N G A S K A V I R I L A M P Y D O N G A T I P F D E G R W L A T E M D : 509
5 5 r L H F n t r 5 p d n g 1 r w 5 e 5 d

NinHc-a : K F D T D I R P S K P L I V F S S I D S S V T L S S T Y T K E L L I ----- G E D L I E D R S E F C S G M P L L V P K S S N K G M F V I E L D : 562
NinHc-b : N G H E V K P I N T I D S S S V T L S K O P L K E L L I ----- G K I T D R R G D E Y C S G M P L L V P K G D S S M G F A I F : 560
NinHc-d : K I T T I L E P R N I T I D S S S V T L S S T Y T K E L L I ----- G E N I P R E T E Y C S G M P L L V P R G T P R G M F V I E L D : 555
NinHc-e : K Q V E L A A K A N I T D H K L S S V T S E T H I T K O L A ----- G E I V S E N T T E F C S G M P L L V P R G S H K S E F D I I L : 557
NinHc-f : K H A E L A P K N I T V R S I E S S V T K P T K S O L S ----- G E I S E N T T E F C S G M P L L V P R G T H K G M D F Y I V M L : 557
NinHc-g : K H K O L A P E N N V I S N A D D S V T L S S T Y T K E L L I ----- G O S A S A D A S E Y C S G M P L L V P R G T H K G M D F O I V M L : 557
PleHc : I E T E V H A D D N E I K S S E S S V A I P D R V S P O L I D D E A V A N A ----- E L P H K E S R G I P O R L L L P K G K E G M D F M D I I T I : 595
PleHc2 : K I Y K S L A P I N H I V R S I D S S V T V D P R S E P L I K S K I T R A V S S H S K D I H K F E R S G P N R L L L P K G A R G M D F A I V G V : 615
HamHcA : K I Y K L K T S K N I T R S I E S S V T V D S L S A E L H E K I D O A V A S S K D I H E Y E R S G P A R L L L P K G T V I G M D F O I V A V : 602
PinHcB : K F Q K V P S P E T I T R S S D S S V T V D P S F S L K H O D E A V N G G H D L S A Y E R S G P D R M L L P K S K P G M F I L V V : 586
PinHcA : K F Q K V P K P E T I T R S S D S S V T V D P S F S L K H O D E A V N G G H D L S A Y E R S G P D R M L L P K S K P G M E F I L V V : 586
PleHc1 : K F M K L A N K N L I T R S S D S S V T V D P S F S L K H O D E A V K N G E D L S A Y E R S G P D R M L L P K S K P G M E F I L V V : 613
PleHc2 : K F M K L A N K N L I T R S S D S S V T V D P S F S L K H O D E A V K N G E D L S A Y E R S G P D R M L L P K S K P G M E F I L V V : 613
PleHc3 : K F M K L G N L M I T R S S D S S V T V D P S F S L K H O D E A V K N G E D L S A Y E R S G P D R M L L P K S K P G M E F I L V V : 614
PleHc4 : K F M K L A N K N L I T R S S D S S V T V D P S F S L K H O D E A V K N G E D L S A Y E R S G P D R M L L P K S K P G M E F I L V V : 614
CmaHc6 : K F V M L H P G H I L T R S S D S S A T V D P S F A I I K O R I N E A I A O N K E L I E E F S G L G P N R L I P K G N V K G L M D V I A I : 585
GroHc : K F T K I A A S O N H K K S S E S S V T V D P S F A I I D D A A V A S S S L I E E F D R A G G P O R M L L P K G T E G L E F L I V A V : 608
CsaHc : K F T K S G S H I T R S S D S S V T V D P S F A I I D D A A I G S S A L I E E F S G L G P N R L I P K K T I G M D F Y I V V : 609
PvaHc1 : K F V K G S T I L I T R S S S A V T V D P S F A I I F E K I C A I G A D S G I K D E S T T G P N R L I P K N E G L E F I V A V : 602
PvaHc : K F V S I K G K T S I L I T R S S S V T V D P S I I D F A E I A G G A ----- G I A K F S A T G P N R L I P K G N D R G L E F I V A V : 594
PinHcC : R E V K V K H Q I D I T O S T S S V T V D P S L K I I D R A A A S S C A I E D Y E S A L G P N R L I P K G Q A G M E F I L V V : 592
HamPhc1 : K F M K Y L A P E N E V I T R S S E S S V T V D P S L K I I H E O A A I A G I S S L I E E V S A T G P N R L I P K G N A A G V E F K I V V : 611
HamPhc2 : K I O K E I P E N T I T R S S E S S V T V D P S L K I I H E O A A I A G S S L I D E V S A T G P N R L I P K G N E A G V E F K I V V : 611
CmaCc1 : L V I K T I T S D N E I T R S S E A S I T V D P T Y K I L V E K I E I R E ----- N E M Y E S T G P N R L L L P K G C E E T E F R I P V A V : 583
F 5 G 5 R 25p p 5 6 P r L5P3g G f 5

NinHc-a : T D A E K K V P T S - G K L C N D A L S Y C G V M D E K Y P D R A I G Y P F D R I T A S H E E F I T P N K I S N I T V R F D ----- : 630
NinHc-b : T I N Y F E D I V N G H R T N E C V D A V S Y C A K D O K Y P D R A I G Y P F D R E I V A D F N E W R O P N I S I P T D I V I S ----- : 628
NinHc-d : T D Y V E D K V L D S A T V V C S D A V S Y C A K D O K Y P D R A I G Y P F D R P I K A R T P S O F K T O N I S F T E V R I O Y G G Y K A ----- : 627
NinHc-e : T D Y E D A V G G - E A S G V C V D A I S Y C A K D O K Y P D K P G F P F D R V I T A D I V A E F I T P N I S C D O V K I K I V I ----- : 625
NinHc-f : T D Y E H D R V N G L N E K S I C A D A V S Y C A K D O K Y P D K S I G F P F D R V I K A R T I A E F S S A V K F O E V K I Q F K E ----- : 626
NinHc-g : T D Y S E D N P F G A N V K T I C N D A V S Y C A K D O K Y P D K P G F P F D R P L L S S V A A K L P T E N T C V D I K I K F L G ----- : 626
PleHc : T S G D A V O D D L T V N A G S T H G Y C G I H G E Y P D R P G F P F D R P D L L V R K V O O H G Q V V K I P T ----- : 660
PleHc2 : T N G E A K T V D P E - E L G - A T H A O C G I H G E Y P D K P G Y P F D R S V D N V A L E S - P N F R V Y V A F L E H D E H Q ----- : 687
HamHcA : T N G E D K V T I H P E T D H G G T H A O C G A G E Y P D K P G Y P F D R S I D E V I D G V - S N I K H A L V K I V H L E H H D ----- : 672
PinHcB : T D D K D I - I G H N G G H Y G G T H A O C G V H G E A F P D N R P G Y P E R I D E V I D G V - S N I K H A L V K I V H L E H H D ----- : 657
PinHcA : T D D K D I - I G H N G G H Y G G T H A O C G V H G E A F P D N R P G Y P E R I D E V I D G V - S N I K H A L V K I V H L E H H D ----- : 657
PleHc1 : T D D K D I - I G S D G D H D H G T H A O C G I H G E O Y P D H R P G Y P E R I D E V I D G V - S N I K H A L V K I V H L E H H D ----- : 684
PleHc2 : T D D K D I - I G S D G D H D H G T H A O C G I H G E O Y P D H R P G Y P E R I D E V I D G V - S N I K H A L V K I V H L E H H D ----- : 684
PleHc3 : T D D K D I - I G S D G D H D H G T H A O C G I H G E O Y P D H R P G Y P E R I D E V I D G V - S N I K H A L V K I V H L E H H D ----- : 685
PleHc4 : T D D K D I - I G S D G D H D H G T H A O C G I H G E O Y P D H R P G Y P E R I D E V I D G V - S N I K H A L V K I V H L E H H D ----- : 685
CmaHc6 : T S G E A D A V E ----- G L H E N T S F N Y G C P D G T Y P D R P G Y P D R I V D D E I I N D L H N F K H I O V K V F H A ----- : 650
GroHc : S D C T T D Q H D A L - E A V D A H G H A O C G V N G E K Y P D H O P G F P D R I I D D I L S A - D N I E K L L I V I T I K H ----- : 675
CsaHc : S D C A K D A V D ----- G L H E S T I Y N H Y G C D G T Y P D N O P G Y P D R V D D E I I T G V - S N F A V D V V Y V E H ----- : 676
PvaHc1 : T D C A A D A V D ----- G L H E N T E Y N H Y G S H G - V Y P D R P G Y P D R V D E V E D L - P N F K H I Q V K V N G E H I H ----- : 671
PvaHc : T D C A A D A V P ----- N L H E N T E Y N H Y G S H G - V Y P D R P G Y P D R V D E V E D L - P N F K H I Q V K V N G E H I H ----- : 662
PinHcC : T D C R T D A L I ----- D L H E N T K F I N Y G Y R - O Y P D R P G Y P D R V D D E I I E A L - P N F K O R T V K L Y S E G V D G G ----- : 661
HamPhc1 : T D C A D A V N D ----- E I N L T T K F H R Y G H H G - V Y D K S H G Y P D R V D E L S H E I - P N F G E T I V K V F N H V H R H E ----- : 684
HamPhc2 : T D V A D A V N D ----- E I N L T T K F H R Y G H H G - V Y D K P G Y P D R V D E L S H E I - P N F G E T I V K V F N D H V Y H H ----- : 681
CmaCc1 : T D A N D V N D E - S I I T M Q K Y H I G V R G - V O D N R P G Y P D R V D E H V D E V - S N I K A T H A V V N V F I P L S ----- : 653
2 d 6 pd p 64P 1R 5 d N 5 5

```

**Alignment 3: Für die Neighbor-joining und Bayes-Stammbäume der Crustaceen verwendete Sequenzen.**



[illegible]

[illegible]

|            |                |        |     |      |
|------------|----------------|--------|-----|------|
|            | 260            | 280    | 300 | 320  |
| NinHc-a    | PAGESDVI       | OV     | DE  | GNII |
| NinHc-b    | HKEE           | DVIT   | NI  | OK   |
| NinHc-c    | STDE           | SKVIEI | OK  | GNII |
| NinHc-e    | HPDK           | DIEIEI | ES  | GNII |
| NinHc-f    | RADIS          | PVIV   | OV  | IO   |
| NinHc-g    | NPTE           | DVVIEI | DE  | GNII |
| ScOHCa     | E-EK           | PVVDAI | EL  | HO   |
| ScOHCd     | LDKV           | PVIDAT | EF  | SD   |
| ScOHCX     | KOI            | PVIDAT | KE  | FD   |
| ScOHCc     | YDRI           | PIIDAT | OT  | SH   |
| ScOHCb     | OED            | PLIDAT | HE  | FD   |
| Sp1Hc1     | HKI            | PVKVDI | NI  | YH   |
| PlHcH      | HKI            | PVKVDI | NI  | YH   |
| PlHc2      | OT             | PGNFKM | EF  | GS   |
| PlHc2      | OT             | PGKFMN | DE  | IG   |
| HamHcA     | OT             | PGRFEM | KE  | IG   |
| PinHcB     | OK             | PGTFNV | SE  | IG   |
| PinHcA     | OK             | QGTFFM | SE  | IG   |
| Pe1Hc1     | HK             | EGTFNM | SE  | IG   |
| Pe1Hc2     | HE             | GNTFDM | SE  | IG   |
| Pe1Hc3     | HK             | EGTFNM | SE  | IG   |
| Pe1Hc4     | HK             | EGTFNM | SE  | IG   |
| CmaHc6     | QT             | AAKLES | EF  | GS   |
| CsaHc      | QT             | ASKKKS | EF  | GS   |
| PvaHc1     | OK             | PGKFS  | SE  | IG   |
| PvAHc      | OK             | PGKFS  | SE  | IG   |
| PlHcC      | NT             | PGKFS  | SE  | IG   |
| HamPHc1    | OK             | PGKFMN | DE  | IG   |
| HamPHc2    | OK             | PGRFEM | KE  | IG   |
| CmaCC1     | KL             | RNVFFQ | NI  | ET   |
| SamEHP     | OK             | PAVYHM | NE  | IG   |
| TdoHc1     |                |        |     |      |
| TdoHc2     |                |        |     |      |
| PmaHc1     | QT             | PAI    | HM  | NE   |
| PmaHc2     | AT             | KTV    | PM  | KE   |
| TdoHx1     | OK             | NAL    | KM  | NI   |
| PmaHx1     | AVDTVYKEG      | ET     | Y   | PA   |
| PmaHx2     | AVDSVYKVI      | K      | T   | Y    |
| PmaHx3     | TDDIFKVI       | K      | T   | Y    |
| PmaHx4     | HVDSVFKOI      | K      | T   | Y    |
| LmiJHBP    | GVFK           | K      | T   | Y    |
| BdiHex     | GLCAED         | RP     | FV  | RA   |
| PamHex12   | DVHLTAP        | K      | T   | Y    |
| RclCyanA   | NAGSGE         | H      | S   | H    |
| RclCyanB   | NYNNTGYEYN     | P      | Y   | G    |
| TmoENP86   | NYNNTGYEYVA    | F      | Y   | G    |
| AgeHx      | NGSGANY        | N      | R   | V    |
| AgeHx2     | RQOHKEKEG      | Y      | D   | T    |
| TdoHx2     | TQHPISVYDS     | Y      | G   | T    |
| LdeDp1     | GOQSEY         | N      | D   | K    |
| AgxHc1     | RDVHQNPGSF     | P      | G   | Y    |
| CFeHx2     | SEAS           | HD     | H   | T    |
| BmHx       | RPTNVDSG       | D      | S   | V    |
| GmelHP82   | VEG            | NI     | Y   | H    |
| HceRbH     | MLEHYPSTYVM    | N      | N   | R    |
| TniAJHSP1  | MIEEYPSTYKWM   | N      | S   | V    |
| MseAry1a   | LVDFEYPTKYWM   | N      | K   | N    |
| MseAry1b   | NKDLAAQHYGMHE  | N      | Y   | V    |
| SlIAry1    | VSADLAAQHYGVKE | N      | Y   | V    |
| HceAry1    | FDEKLAAGQYGMVK | N      | Y   | V    |
| BmoSSP2    | LHPTKAINYGIVKE | N      | Y   | V    |
| GmeAry1    | INPEAAAKYGIHKE | N      | Y   | V    |
| CceHx2     | IPEQGPYGYILSK  | N      | A   | Y    |
| CceHx2a    | IVPEQAEKYGIITK | N      | D   | Y    |
| HceMthF    | IVPEQAEKYGIITK | N      | D   | Y    |
| SlcMHRSP-A | LDLKLSEFYGIKKT | N      | D   | V    |
| SlcMHRSP-B | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| HcuS2      | LDHKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| TniBJHSP2  | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| PinSP1     | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| TniBJHSP1  | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| HcuSP1     | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| MseMRSP    | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| SlcMRSP    | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| BmoSSP1    | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| HceMTHS    | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| PinSP2     | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| DelSP2     | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| Cv1SP2     | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| MDolSP2    | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| AgxH1      | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| DelSP1a    | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| DelSP1g    | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| Cv1SP1a    | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| Cv1SP1b    | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |
| MDolSP1    | LDLKLDFYGIKKT  | N      | D   | V    |

```

NinHc-a : HVVY--PSVYDSKF---FQKKDRIDGEF--YMHQOMQARYCERLSNGTRVPFFNKEPL--EGYAAHLTHIASR : 249
NinHc-b : HLVI--PATWRPEV---IGRI DRKGEF--YMHQOMQARYCERLSNHQMPIPFFNKEPL--EGYSAHLSNINCL : 247
NinHc-d : HLVI--PATYRPDF---FQKV DRKGEF--YMHQOMQARYCDRLVGRMPIPFFNKEPL--EGYSAHLGLISLCL : 244
NinHc-e : HLVI--PATWRPEV---MCKL DRKGEF--YMHQOMQARYCERLSNGRRMPIPFFNKEEL--EGYSAHLTSLVSLCL : 244
NinHc-f : HLVI--PATWRPEI---MCKV DRKGEF--YMHQOMQARYCDRLSTGQRMPIPFFNKEKL--EGYSPHLTSLVSLCH : 245
NinHc-g : HVLI--PANWSVEL---TGKV DRKGEF--YMHQOMQARYSERLSNGNRMAVAFHNKEKL--EGYAPHLTSLVSLCL : 244
ScoHcA : HVH--PAVWLPKH---GPR DRKGEF--YMHQOMQARYSERLSNLPRTPEFFNNDPL--EEGYAPHLTIHKTGY : 271
ScoHcD : VIH--PAIWLPHK---GVL DRKGEF--YMHQOMQARYTERLSNDPRVRPFENNDDPT--DEGYAPHLTIIDKTY : 280
ScoHcX : HVMN--SALKRYP--TEGEKKFYRKGEF--YMHQOMQARYTERLSNGPRCPTEFFNDDPT--AEGYASHLAVDRTY : 287
ScoHcC : VIH--PAIWSEL---GNE DRKGEF--YMHQOMQARYAERMNGARTRTFFNDDPT--DEGYAPHISIMKTY : 281
ScoHcB : VIH--PAVWQESLEELTHOH DRKGEF--YMHQOMQARYAERLSNGPRSTTEFFNDDPT--ETGYAPHLTIIDRTY : 276
SpiHc1 : VLIH--SIWTDI---G E DRKGEF--YMHQOMQARYSERLSNHPRPSLDDKKV--KLG YAPHLTIORTGY : 267
AgiHc1 : FVKN--STWHQGV---E LAKGEF--YMHQOMQARYSERLSNVHPRPSLDDKKV--KLG YAPHLTIORTGY : 267
PleHc : HMDF--PFWN---SAK DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNFPVAVDELY--ORPH--KDG YAPH--TTIKYGY : 279
PleHc2 : HMDF--PWKDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 295
HamHcA : HMDF--PWKDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 282
PinHcB : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPL--TSKFGY : 266
PinHcA : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPL--TSKFGY : 266
PelHc1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 294
PelHc2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 294
PelHc3 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 294
PelHc4 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 295
CmaHc6 : HLEF--PWDDAH---ENHHIERKGESCSVH--QITVRFDAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG FDPQ--AVIKYGY : 266
CsaHc : HLEF--PWDDSH---ENHHIERKGESCSVH--QITVRFDAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 289
PvaHc1 : HMF--PWQDKY---SHH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 284
PvaHc : HMF--PWQDKY---SHH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 289
PinHcC : HMF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
HamHc1 : HMF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
HamHc2 : HMF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
CmaC1 : HMF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
SanEH1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
TdoH1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
TdoH2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
PmaHc1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
PmaHc2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
PmaHx1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
PmaHx2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
PmaHx3 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
PmaHx4 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
TbuHxP1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
LmlJHBP : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
BdlHxP : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
PamHx12 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
RclIcyaN : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
RclIcyaNB : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
TmoENP86 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
AgeHx : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
AgeHx2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
TmoHx2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
LdeD1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
AgrHx1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
CfeHx2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
BheHx : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
GmeLHP82 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
HceRBH : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
TniAJHSP1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
MseArv1a : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
MseArv1b : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
SliArv1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
HceArv1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
BmoSSP2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
GmeArv1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
CceHx2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
CceHx2a : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
HceMTHF : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
SliMMRSP-A : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
SliMMRSP-B : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
HcuSP2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
TniBJHSP2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
PinSP1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
TniBJHSP1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
HcuSP1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
MseMRSP : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
SliMRSP : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
BmoSSP1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
HceMTHS : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
PinSP2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
DmeLSP2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
CvILSP2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
MdoLSP2 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
AqaHEX1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
DmeLSP1a : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
DmeLSP1q : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
CvILSP1a : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
CvILSP1b : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272
MdoLSP1 : HMDF--PWQDSY---GYH DRKGEF--YMHQOLITARYAERLSNMDVDELH--EDVI--HEG YAPH--TSKFGY : 272

```

[illegible]



```

NinHc-a : G M I T A T S R D P F Y R F H R E I D N L F O E Y K K T G V Y S R D N L T F D T E T T S K V A K ----- I T N V I T I R D E L E L : 419
NinHc-b : G M D T A T A R D P F Y R W H R E I D D L F O E Y K K T G V Y S R D N L T F D T E T T S K V A K ----- Q P N T V I T F R E D F L V : 417
NinHc-d : G M D T S T A R D P F Y R Y H R E I D N L F O E Y K R R S S Y T P O D L S G V R V I V I T V A K ----- V P N L I T T S K D A Y L E L : 414
NinHc-e : G M S T S T S R D P F Y R Y H R E I D N L F O D Y K Q T G K V D K A Q L D G V Q V I V I T V A K ----- V P N L I T T F M K D D L E L : 414
NinHc-f : G M S T S T S R D P F Y R Y H R E I D N L F O E Y K A T G K V D K K D L D G V S V I V I T V A K ----- L P N I V I T Y L K E D L E L : 416
NinHc-g : G M S T S T S R D P F Y R W H R E I D N L F O D Y K S T G V Y T E Q L S G V K A V S C E V K A K ----- Q N N V I T T F K D E L T L : 414
ScoHcA : G M H D V A T S A R D P F Y R W H R E I D N L L E Y K D N L D F Y T Q Y E L T F D V V I N D V I T V K P H K - G D Y - D D E V I T Y W E V D N Y L : 444
ScoHcD : G A N Y V A T S A R D P F Y S W H K E I D N L F O E H K E T G V Y N K D E L N F D V Q V S L R I N V A N - G T Y - E N I V R I Y W O S L F K I : 453
ScoHcX : G M Y D V A T S A R D P F Y O W H K E I D N L F Y E H L T K P T N H L F H U N F D V S H T L E I I - S N - G R - K N E I T F W E D I M E L : 461
ScoHcC : G M Y D V A T S A R D P F Y R W H K E I D N L F O E Y K N T G V Y T T E E L T F O N S E F R V G - I S V G E T S A R D T V I T Y W O S L L K V : 455
ScoHcB : G A N Y V A T S A R D P F Y O W H K E I D N L F E Y K D A K K - A Y S S E D L T F D T T E L V V G E G G S P - - - A N T V I T F L E S I V L : 449
SpiHc1 : G A N Y V A T S A R D P F Y S W H K E I D N L F E Y Q M T T F Y T P Y O L I D V V V G C H L E N L K T H E - - - E N M I T Y T S S T L R : 442
AgiHc1 : G A N Y V A T S A R D P F Y S W H K E I D N L F E Y Q M T T F Y T P Y O L I D V V V G C H L E N L K T H E - - - E N M I T Y T S S T L R : 442
PleHc : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K E H K D L P F Y T E D L F G V S V I T A I G H - - - - - S I F F E F F F D : 445
PleHc2 : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K E H K D L P F Y T E D L F G V S V I T A I G H - - - - - K I Y F D I F F S : 462
HamHcA : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K E H K D L P F Y T A D L E I G V A E L E V I G Q - - - - - L I T F F D F F F S : 449
PinHcB : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K K H T D S F F Y T H D L E A G M V V G A I G E - - - - - L I T F F D F F Y S I : 433
PinHcA : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K K H T D S F F Y T H D L E S G M V V G A I G E - - - - - L I T F F D F F Y S I : 433
PelHc1 : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K E H T D S F F Y T H D L E F G V S V I T A I G H - - - - - L I T F F D F F Y S I : 461
PelHc2 : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K E H T D S F F Y T H D L E F G V S V I T A I G H - - - - - L I T F F D F F Y S I : 461
PelHc3 : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K E H T D S F F Y T H D L E F G V S V I T A I G H - - - - - L I T F F D F F Y S I : 461
PelHc4 : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K E H T D S F F Y T H D L E F G V S V I T A I G H - - - - - L I T F F D F F Y S I : 462
CmaHc6 : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F R K H K D L P F Y T K E E L N E G V N D N F Y I K G N - - - - - L E T Y F E T F E Y S I : 432
CsaHc : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F R K H K D L P F Y T K D L E S G I S V S L D I S N R - - - - - L E T Y F E T F E Y S I : 456
PvaHc1 : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K E H K D L P F Y T E E L T F A G V S V S V A I G E - - - - - L E T Y F E T F E Y S I : 451
PvaHc : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K E H K D L P F Y T A D L E S G V S V I T A I G E - - - - - L E T Y F E T F E Y S I : 447
PinHcC : G M E F T S T R D P A F F R L H K Y D N L F R K H K D L P F Y T R D L E F G V S V S I A I G E T - - - - - L E T F F E T F E Y S I : 439
HamHc1 : S G L E Y T A R D P A F F R L H K Y D N L F R K H K D L P F Y S Q E L L F G V A N I D I G P - - - - - L E T F E T F E Y S I : 457
HamHc2 : S G L E Y T A R D P A F F R L H K Y D N L F R K H K D L P F Y S Q E L L F G V A N I D I G P - - - - - L E T F E T F E Y S I : 455
CmaC1 : G I A L L P R D P A A R L H K Y D N L F R H I S L P F Y T K E E L T G I I T S L V I G S - - - - - L E T F E T F E Y S I : 435
SamEHP : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F E H K D L P F Y T S E E L F E T S L E V O L D - - - - - L E T F F E T F E Y S I : 455
TdoHc1 : G M E F T A T : - - - - - : 180
TdoHc2 : G M E F : - - - - - : 175
PmaHc1 : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K M Y K D L P F Y T K A E L E F G V K V L W E I G N - - - - - L I T F F E T F E Y S I : 455
PmaHc2 : G M E F T A T R D P A F F R L H K Y D N L F K H K D M T F Y T K E E L D E G V T D A V K V G - K S E D S T - A N O - - - - - L I T F F D F F I D : 457
TdoHx1 : S G L E Y T S R D P A F Y S I H K I N R F O K H K E N L P O Y T R O D I E O G V K V I V E V K - - - - - L I T F F E T F E Y S I : 472
PmaHx1 : S G L E T T A R D P A Y Y I L Y K I D T F K S Y K K L P E Y T Y D E L T F G V K V S V I E K - - - - - L I T F F D F F I D L : 472
PmaHx2 : G M E F T A R D P A Y Y I L Y K I D T F K S Y K K L P E Y T Y D E V I T F G Y K I E S F E T K - - - - - L I T F F D F F I D L : 384
PmaHx3 : P A L E I T T R D P A Y Y I L Y K I D T F K K Y A N L P K Y T I D E L T F G V K V S V I E K - - - - - L I T F F D F F I D L : 329
PmaHx4 : S G L E Y T A R D P A Y Y I L Y M E K F H R Y S L L P T Y T K E E L F G V K I E V E V K - - - - - L I T F F D F F I D L : 369
TbuHxP1 : G M E F T A R D P A Y S M Y K I E Y F S S K E N L P H Y T I D E L V F G V K I E S L E V K - - - - - L I T F F D F F I D L : 336
LmlJHBP : S A L D M H L I Y R D P L Y R I I K I Y G E F E Y K N N P F Y H A D D L F G G V K I E L K V D K - - - - - L I T F F D F F I R I : 463
BdlHxP : S A L O T Y T A R D P A N H I L K H I N S Y Q R Y G Y P F Y T Y D E L V F G V K I E V D G K - - - - - L I T F F D F F I D L : 504
PamHx12 : S L E P E L Y R D P F Y O L K Y V D L F O K Y K R P F Y T H D E L A F G V K I E V D G K - - - - - L I T F F E T F E Y S I : 459
RclIcyaA : N A S T P M L R D P F Y N H V A L L V F O H K R S G Y T R O D E V F G V K I E V E V K - - - - - L I T F F D F F I Y A : 472
RclIcyaB : G A S T I L T A R D P F Y S Y A A L L I F O H R T L E R O D E V F G V K I E V E V K - - - - - L I T F F D F F I Y A : 472
TmoENP86 : S A L D T S T S R D P A F O L F E K I Y H F R F A Q H Y K A I M K D L F E G V I K I E F R - - - - - L I T F F D F F I Y A : 476
AgeHex : S A L E F T S R D P F F O L Y K I L V L K Q R Y K A R I H Y T E D L I F G V K I L E F R - - - - - L I T F F D F F I Y A : 481
AgeHex2 : S A L E F T S R D P F F O L Y K I L I L Y T M Y K L F H S Y K O L M S G V D I S L E F D K - - - - - L I T F F D F F I Y S D : 472
TmoHex2 : S A L E F T S R D P A F F O L Y K I L S Y I R Q A N H K H Y N E D L M G V G E K I E F F S - - - - - L I T F F D F F I Y A : 472
LdeDp1 : S A L E Y T C R D P A F F O L Y K I L M K M O R L S D L P F Y T E E L L F G V S V E G E F R P - - - - - L I T F F D F F I Y S I : 478
AgrHex1 : S A L O P A T A R D P A F F O L Y K I L L F V I F O H R Y M T F I K D O L F F G V S I K V E D R - - - - - L I T F F D F F I Y S I : 487
CfeHex2 : S A L O C Y S T S R D P A F F R L T K I M V Y F R Y K N L P O Y T O D E L I F G V K F E S V I D K - - - - - L I T F F D F F I Y D I : 467
BheHex : S A L E S S T C R D P A F F R L Y N R Y S Y Y R F K E T L K F Y S K N E I F S D L K F E S T A V K - - - - - L I T F F D F F I Y S I : 466
GmeLHP82 : S L E E Y T A R D P A F Y M I M K V L K I E N L H E H L P H Y T T K E L S V S V K I E K V E V K - - - - - L I T F F E T F I N V I : 478
HceRBH : S A L E Y T A R D P A F Y M I M K V L K I E S L H H R L P O Y K N E E L A L T D V I T E K V E V K - - - - - M I T F E Y T Y T I : 476
TniAJHSP1 : S L E E Y T A R D P A F Y M I M K V L G F O D W O E K L P H Y K P E E L A M P V A T E K V D O K - - - - - L I T F F E Y S Y M V : 480
MseAry1a : S A L D F Y T S R D P A F F O L Y D R I I N Y I N F K O Y L O F Y S S E K A E K G V K I V D V V K - - - - - L I T F F E Y Y O F D V : 482
MseAry1b : S A L D F Y T S R D P A F F O L Y N R I L K Y I E Y K O Y L O F Y S S E K A E K G V K I V D V V K - - - - - L I T F F E Y Y O F D A : 479
SliAry1 : S A L D F Y T S R D P A F F O L Y O R I I L Y I D Y K O Y K P Y N H D L F F G V K I N D V E S E - - - - - L I T F F E Y Y O F V : 472
HceAry1 : S A L D F Y T A R D P A F F O L Y N R I N G Y I N A F K H Y I V Y P O K L F F G V K I N D V E K - - - - - L I T F F E Y F E F D A : 480
BmoSSP2 : S A M D F Y T S R D P A F F O L Y N R I N G Y I E F K O Y K P Y T O K L F F G V K I T V K O K - - - - - L I T F F E Y F E F D A : 479
GmeAry1 : T A L D F Y T S R D P A F F O L Y A L I D Y I N E Y K E Y L E S O D V M H F G V K I N D V K O K - - - - - L I T F F E Y F D W A : 482
CceHex2 : A A L D F Y T S R D P A F F O L Y G I L E Y I I D Y K E H L E Y T K V M H F G V K I N D V K O K - - - - - L I T F F E Y F D W A : 483
CceHex2a : A A L D F Y T S R D P A F F O L Y R I L Y I I D Y K E Y L E Y S K V M H F G V K I N D V K O K - - - - - L I T F F E Y F D W A : 483
HceMTHF : T I L D S Y T A R D P F F O L O K I I D L V L F L K R P O Y T K E E L F F G V K I E V V O K - - - - - L I T F F D F F M D : 479
SliMMRSP-A : T I L D I Y T A R D P F F Y M L O K I I D L V C L F K L R P S Y T K E D L F F G V K I D V N O K - - - - - L I T F F D F F M D : 482
SliMMRSP-B : S I L D Y T A R D P F F Y M L O K I I D L V C L F K L R P S Y T K E D L F F G V K I D V N O K - - - - - L I T F F D F F M D : 480
HcuSP2 : N I L D Y T A R D P F F Y M L O K I I D L V H L F K L R P S Y S K E D L F F G V K I D V D O K - - - - - L I T F F D F F M D I : 476
TniBJHSP2 : S I L D Y T A R D P F F Y M L O K I I D L V H L F K L R P S Y T K E D L F F G V K I D V D O K - - - - - L I T F F D F F M D : 479
PinSP1 : T I L D I Y T A R D P F F O L O K I L L F V O L F K L R P S Y T K E E L F F G V K I D V V O K - - - - - L I T F F D F F M D : 483
TniBJHSP1 : T A L D L Y T C R D P F F R L M K V T D T F L F K M L P K Y T R E D F F G V K I E K F T T K - - - - - L I T F F D F F M D I : 478
HcuSP1 : T A L D M Y T T C R D P F F O L I K V T N T V Q T F K M L P K Y T R E D F F G V K I O K I S T K - - - - - L I T F M D F F M D I : 482
MseMRSP : T A L D M Y T T C R D P F F M I M K V T N T F V M F K D L P K Y T H E E L F F G V K I E I T T K - - - - - L I T F M D F F M D I : 482
SliMRSP : T A L D M Y T T C R D P F F R L M K V T D V F L F K M L P K Y T R O D F F G V K I O R F T T K - - - - - L I T F M D F F M D I : 480
BmoSSP1 : T A L D M Y T T C R D P F F M I M K V C N E T V F K M L P K Y T R E F S F G V K I E I T T E - - - - - L I T F M D F F M D I : 481
HceMTHS : T A L D M Y T T C R D P F F K I M K V M N S E V F K M L P S I T R E E D F F G I K I E I T T E K - - - - - L I T F M D F F M D I : 483
PinSP2 : T A L D M Y T T C R D P F F K I M K V M N S E V F K M L P S I T R E E D F F G I K I E I T T E K - - - - - L I T F M D F F M D I : 481
DmeLSP2 : G E F M Y T S R D P F F E Y M I S Y M L M E T Y F E H K K Y A F F G V K I E V A I G E - - - - - S I T F F E T F E Y S I : 462
CviLSP2 : A L I M Y T S R D P F F S I V I D I S Y W R L M A T Y F E H K P O L E F G V K I S V H I P E - - - - - S I T F F E T F E Y S I : 461
MdoLSP2 : G T S Y Y T S R D P F F S Y L E L V G Y W L A G N F F E O K K D L E F G V T D E V L P E - - - - - K I T E L F F R S D : 454
AqaHEX1 : S A L M E F T S R D P F F O L Y E F M L Y Y F R F R P S Y T E E L N E G V V I K I V T F D K - - - - - L I T F F D F F S D : 471
DmeLSP1a : N I L L E I T M R D P F F Y F Y K S I A N V F D M H I L P K Y T K E O L M G V T I K I E V S E - - - - - L I T F F D L V O F V : 526
DmeLSP1q : N I F L L E I T M R D P F F Y T F Y K E T D F Y T F Y Y K F Y T O K D L F E G I T T K E V S K - - - - - L I T Y D I V O F V : 531
CviLSP1a : H I F L Y I T M R D P F F Y F Y K I A S Y F O F F N Y K S Y T H E E L L F G V T H K I V K S E - - - - - L I T F F D L V O F V : 518
CviLSP1b : H I F L Y I T M R D P F F Y F Y K I A S Y F O F F N Y K S Y T H E E L L F G V T H K I V K S E - - - - - L I T F F D L V O F V : 518
MdoLSP1 : S W F L Y I T M R D P F F Y M I Y K I T D F O E Y E I D P Y T H K D L F G V E L S V K S D - - - - - L I T F F D L F O F V : 539

```

[illegible]

|            |   |                                                                           |       |     |
|------------|---|---------------------------------------------------------------------------|-------|-----|
| NinHc-a    | : | PLDEORRLYEIMDKFDTDTRPKNTLVRSSDSTVTSSTYFELH-----GEDL--EEDRSE--FCSC6        | POHL  | 544 |
| NinHc-b    | : | KISNTIRLMIELDNHVEIKPGINTVERRSIDSSVTSKOPILKELQ-----GKGT--DRRGDE--YCS66     | PDHL  | 542 |
| NinHc-d    | : | LVLEDRRLYEIMDKFDTTTEPGRNTVRRSSDSSVTSSTYFELH-----GENI--PNRETE--YCS66       | PEHL  | 537 |
| NinHc-e    | : | DPHEORTLCIELDKFQVEIAAGKNAITRDHKLSSVTSSTYFELH-----GEGV--SENTTE--FCSC6      | PEHL  | 539 |
| NinHc-f    | : | SLNEARFFIELDKFAELAPGNVITRKSTESSVTSKPTPKSOLQS-----GEGI--SENSTE--FCSC6      | PEHL  | 539 |
| NinHc-g    | : | ISPDORPLFIELDKFKQLAPGNVITRKSTESSVTSSTYFELH-----GQSA--SADASE--YCS66        | PEHL  | 539 |
| ScoHcA     | : | FPVNEORQLLVIELDKFVATIEPGRNITRKSTESSVTSKDHVGETRN-----LADDH--QCSC6          | PDVL  | 564 |
| ScoHcD     | : | YILNDORHLVIELDKFTVNLKPGKNSVROPCTNSAVTAKYDVFGLME-----SQKPQE--GCNC6         | PDVL  | 573 |
| ScoHcX     | : | LSLEEMVRMAVIEKRVIPAKPGSDTVIS--SRSGAPANKFSGSEERYI-----SEDCNF--HSHC6        | PNVL  | 583 |
| ScoHcC     | : | WHINDORLIMVEMDKFIEKTYPKNTLVRSSDSTVTSSTYFELH-----SEQSED--HCSC6             | PDVL  | 574 |
| ScoHcB     | : | PDFNEORGMALIELDKFVATIEPGRNITRKSTESSVTSKDHVGETRN-----TRSSEN--HCSC6         | PDVL  | 568 |
| SpIHc1     | : | ITLDEORVMVIELDKFKATIKPGNTVRRSSDSSVTSKOPILKELQ-----TDED--HCHC6             | PDVL  | 562 |
| AqIHc1     | : | ITLDEORVMVIELDKFKAPIKPGNTVRRSSDSSVTSKOPILKELQ-----TDED--HCHC6             | PEVL  | 562 |
| PlEHc      | : | LDIDESWGAITLDTWTEHAGDVEIKKKSSTVATPDRVFPPIHDADEAVANGA--ELPHKE--SRSC6       | IPORL | 577 |
| PlEHc2     | : | FTWEEGHWHIEMDKFYKSLAPGINTVRRSSDSSVTSKOPILKELQ-----LDHKEF--ERSC6           | IPORL | 597 |
| HamHcA     | : | PLSEGHMTCTIEMDKFYKSLKSGNKDKKSTESSVTPDSSLALAEHEKTDQAVASGSK--LDHEY--ERSC6   | IPORL | 584 |
| PinHcB     | : | ITLDEARWFCIELDKFFOKVPKGPETHERRSSDSSVTPDWPSPFOSKEQADNAVNGHD--LD.SAY--ERSC6 | IPDRM | 568 |
| PinHcA     | : | ITLDEARWFCIELDKFFOKVPKGPETHERRSSDSSVTPDWPSPFOSKEQADNAVNGHD--LD.SAY--ERSC6 | IPDRM | 568 |
| PeIHc1     | : | INLDEARWLCIELDKFWTKLANGNLIERRSSDSSVTPDWPSPFOSKEQADNAVNGHD--LD.SAY--ERSC6  | IPDRM | 595 |
| PeIHc2     | : | INLDEARWLCIELDKFWTKLANGNLIERRSSDSSVTPDWPSPFOSKEQADNAVNGHD--LD.SAY--ERSC6  | IPDRM | 595 |
| PeIHc3     | : | INLDEARWLCIELDKFWTKLANGNLIERRSSDSSVTPDWPSPFOSKEQADNAVNGHD--LD.SAY--ERSC6  | IPDRM | 596 |
| PeIHc4     | : | INLDEARWLCIELDKFWTKLANGNLIERRSSDSSVTPDWPSPFOSKEQADNAVNGHD--LD.SAY--ERSC6  | IPDRM | 596 |
| CmaHc6     | : | FSFNEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 567 |
| CsaHc      | : | FSFNEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 591 |
| PvaHc1     | : | FTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 584 |
| PvaHc      | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 576 |
| PinHcC     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 574 |
| HamHc1     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 595 |
| HamHc2     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 593 |
| CmaC1      | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 565 |
| SamEHP     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 588 |
| TdoHc1     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 588 |
| TdoHc2     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 588 |
| PmaHc1     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 588 |
| PmaHc2     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 584 |
| TdoHc1     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 614 |
| PmaHx1     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 607 |
| PmaHx2     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 607 |
| PmaHx3     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 464 |
| PmaHx4     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 504 |
| TbuHx1     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 471 |
| LmlJHBP    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 595 |
| BdlHex     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 639 |
| PamHx12    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 593 |
| RclIyanA   | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 607 |
| RclIyanB   | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 606 |
| TmoENP86   | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 611 |
| AgeHex     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 617 |
| AgeHex2    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 606 |
| TmoHex1    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 608 |
| LdeHx2     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 613 |
| AgrHex1    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 623 |
| CfeHex2    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 602 |
| BheHex     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 599 |
| GmeLHP82   | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 616 |
| HceRBH     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 614 |
| TniAJHSP1  | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 616 |
| MseAry1a   | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 613 |
| MseAry1b   | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 611 |
| SliAry1    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 603 |
| HceAry1    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 612 |
| BmoSSP2    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 611 |
| GmeAry1    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 613 |
| CceHex2    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 614 |
| CceHex2a   | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 614 |
| HceMTHF    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 617 |
| SliMMRSP-A | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 620 |
| SliMMRSP-B | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 618 |
| HcuSP2     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 614 |
| TniBJHSP2  | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 617 |
| PinSP1     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 621 |
| TniBJHSP1  | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 618 |
| HcuSP1     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 623 |
| MseMRSP    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 621 |
| SliMRSP    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 621 |
| BmoSSP1    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 620 |
| HceMTHS    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 622 |
| PinSP2     | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 620 |
| DmeLSP2    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 613 |
| CviLSP2    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 613 |
| MdoLSP2    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 603 |
| AqaHEX1    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 603 |
| DmeLSP1a   | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 665 |
| DmeLSP1q   | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 670 |
| CviLSP1a   | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 657 |
| CviLSP1b   | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 657 |
| MdoLSP1    | : | YTFDEGRWNATEIMDKFWMLHPGNHITERRSSDSSVTPDIPSPQITKDRTNEIAQNKELHTEEF--ESGL6   | IPNRF | 678 |

|            |   |           |     |     |     |     |   |     |
|------------|---|-----------|-----|-----|-----|-----|---|-----|
| NinHc-a    | : | LVPKGSNK  | 820 | 840 | 860 | 880 | : | 620 |
| NinHc-b    | : | LIPKGDSSG |     |     |     |     |   | 619 |
| NinHc-d    | : | LVPGRTPR  |     |     |     |     |   | 614 |
| NinHc-e    | : | LIPRGHKG  |     |     |     |     |   | 615 |
| NinHc-f    | : | LVPGRTHG  |     |     |     |     |   | 616 |
| NinHc-g    | : | LVPGRTHG  |     |     |     |     |   | 616 |
| ScoHcA     | : | LLPKGYEG  |     |     |     |     |   | 641 |
| ScoHcD     | : | LLPKGYEG  |     |     |     |     |   | 649 |
| ScoHcX     | : | LVPKGSST  |     |     |     |     |   | 660 |
| ScoHcC     | : | LVPKGNF   |     |     |     |     |   | 651 |
| ScoHcB     | : | LIPKGNH   |     |     |     |     |   | 644 |
| SpIHc1     | : | LVPDGYD   |     |     |     |     |   | 638 |
| AqlHc1     | : | LVPDGYD   |     |     |     |     |   | 638 |
| PleHc      | : | LLPKGKEG  |     |     |     |     |   | 651 |
| PleHc2     | : | LLPKGAR   |     |     |     |     |   | 671 |
| HamHcA     | : | LLPKGTVN  |     |     |     |     |   | 660 |
| PinHcB     | : | LLPKSKPE  |     |     |     |     |   | 643 |
| PinHcA     | : | LLPKSKPE  |     |     |     |     |   | 643 |
| PeIHc1     | : | LLPKSKPO  |     |     |     |     |   | 670 |
| PeIHc2     | : | LLPKSKPO  |     |     |     |     |   | 670 |
| PeIHc3     | : | LLPKSKPO  |     |     |     |     |   | 671 |
| PeIHc4     | : | LLPKSKPO  |     |     |     |     |   | 671 |
| CmaHc6     | : | LIPKGNV   |     |     |     |     |   | 640 |
| CsaHc      | : | LLPKGTG   |     |     |     |     |   | 664 |
| PvaHc1     | : | LIPKGN    |     |     |     |     |   | 656 |
| PvaHc      | : | LLPKGN    |     |     |     |     |   | 648 |
| PinHcC     | : | LLPKGAQ   |     |     |     |     |   | 646 |
| HamHc1     | : | LIPKGA    |     |     |     |     |   | 667 |
| HamHc2     | : | LLPKGA    |     |     |     |     |   | 665 |
| CmaC1      | : | LLPKGCE   |     |     |     |     |   | 637 |
| SamEHP     | : | LLPKGR    |     |     |     |     |   | 662 |
| TdoHc1     | : |           |     |     |     |     |   |     |
| TdoHc2     | : |           |     |     |     |     |   |     |
| PmaHc1     | : | LLPKGRNT  |     |     |     |     |   | 664 |
| PmaHc2     | : | LVPKGRPE  |     |     |     |     |   | 661 |
| TdoHx1     | : | LLPKGKA   |     |     |     |     |   | 685 |
| PmaHx1     | : | LLPKGKKG  |     |     |     |     |   | 682 |
| PmaHx2     | : |           |     |     |     |     |   |     |
| PmaHx3     | : | LLPKGKPE  |     |     |     |     |   | 539 |
| PmaHx4     | : | LLPKGKSG  |     |     |     |     |   | 580 |
| TbuHxP1    | : | LLPKGKNG  |     |     |     |     |   | 547 |
| LmlJHBP    | : | LLPRGSP   |     |     |     |     |   | 652 |
| BdIHxP     | : | LLPKGKTG  |     |     |     |     |   | 712 |
| PamHx12    | : | LLPKGKGA  |     |     |     |     |   | 666 |
| RcIcyAnA   | : | QLP       |     |     |     |     |   | 674 |
| RcIcyAnB   | : | QLP       |     |     |     |     |   | 672 |
| TmoENP86   | : | MLPKGYG   |     |     |     |     |   | 678 |
| AgeHx      | : | MLPKGTG   |     |     |     |     |   | 692 |
| AgeHx2     | : | MLPKGTG   |     |     |     |     |   | 681 |
| TmoHx1     | : | MLPKGSG   |     |     |     |     |   | 674 |
| LdeHx2     | : | MLPRGSSA  |     |     |     |     |   | 683 |
| AgHx1      | : | MLPKGSHS  |     |     |     |     |   | 695 |
| CfeHx2     | : | VLPGKRG   |     |     |     |     |   | 665 |
| BheHx      | : | LLPKGRAG  |     |     |     |     |   | 660 |
| GmeLHP82   | : | LLPKGRVG  |     |     |     |     |   | 684 |
| HceRbH     | : | LTPKGRVG  |     |     |     |     |   | 676 |
| TniAJHSP1  | : | LLPKGRVG  |     |     |     |     |   | 688 |
| MseAry1a   | : | MLPRGTG   |     |     |     |     |   | 673 |
| MseAry1b   | : | MLPRGTG   |     |     |     |     |   | 671 |
| SliAry1    | : | MLPRGSLG  |     |     |     |     |   | 663 |
| HceAry1    | : | MLPRGTG   |     |     |     |     |   | 672 |
| BmoSSP2    | : | MLPRGTG   |     |     |     |     |   | 671 |
| GmeAry1    | : | LTPRGTRG  |     |     |     |     |   | 674 |
| CceHx2     | : | MLPRGTG   |     |     |     |     |   | 675 |
| CceHx2a    | : | MLPRGTG   |     |     |     |     |   | 675 |
| HceMTHF    | : | LLPKGSVS  |     |     |     |     |   | 691 |
| SliMMRSP-A | : | LLPKGVG   |     |     |     |     |   | 693 |
| SliMMRSP-B | : | LLPKGVG   |     |     |     |     |   | 691 |
| HcuSP2     | : | LLPKGIG   |     |     |     |     |   | 687 |
| TniBJHSP2  | : | LLPKGVG   |     |     |     |     |   | 690 |
| PinSP1     | : | LLPRGRVG  |     |     |     |     |   | 694 |
| TniBJHSP1  | : | LLPKGRRG  |     |     |     |     |   | 689 |
| HcuSP1     | : | LLPKGRG   |     |     |     |     |   | 694 |
| MseMRSP    | : | LLPKGRG   |     |     |     |     |   | 692 |
| SliMRSP    | : | LLPKGRG   |     |     |     |     |   | 692 |
| BmoSSP1    | : | MLPLGTG   |     |     |     |     |   | 691 |
| HceMTHS    | : | LLPLGTG   |     |     |     |     |   | 693 |
| PinSP2     | : | LLPLRAG   |     |     |     |     |   | 691 |
| DmeLSP2    | : | MLPKGKG   |     |     |     |     |   | 685 |
| CvILSP2    | : | MLPKGKG   |     |     |     |     |   | 685 |
| MdoLSP2    | : | LLPKGKG   |     |     |     |     |   | 675 |
| AqaHEX1    | : | LIPKGTG   |     |     |     |     |   | 674 |
| DmeLSP1a   | : | LLPKGKG   |     |     |     |     |   | 736 |
| DmeLSP1q   | : | VLPGKWE   |     |     |     |     |   | 740 |
| CvILSP1a   | : | VLPGKWE   |     |     |     |     |   | 727 |
| CvILSP1b   | : | VLPGKWE   |     |     |     |     |   | 727 |
| MdoLSP1    | : | LLPRGWE   |     |     |     |     |   | 747 |

```

NinHc-a      : ----- :
NinHc-b      : ----- :
NinHc-d      : ----- :
NinHc-e      : ----- :
NinHc-f      : ----- :
NinHc-g      : ----- :
ScoHcA       : ----- :
ScoHcD       : ----- :
ScoHcX       : ----- :
ScoHcC       : ----- :
ScoHcB       : ----- :
SpiHc1       : ----- :
AgIHc1       : ----- :
PleHc1       : ----- :
PleHc2       : ----- :
HamHcA       : ----- :
PinHcB       : ----- :
PinHcA       : ----- :
PelHc1       : ----- :

```

|            |           |     |
|------------|-----------|-----|
| Pe1Hc2     | : - - - - | -   |
| Pe1Hc3     | : - - - - | -   |
| Pe1Hc4     | : - - - - | -   |
| CmaHc6     | : - - - - | -   |
| CsaHc      | : - - - - | -   |
| PvaHc1     | : - - - - | -   |
| PvaHc      | : - - - - | -   |
| PinHcC     | : - - - - | -   |
| HamPHc1    | : - - - - | -   |
| HamPHc2    | : - - - - | -   |
| CmaCC1     | : - - - - | -   |
| SamEHP     | : - - - - | -   |
| TdoHc1     | : - - - - | -   |
| TdoHc2     | : - - - - | -   |
| PmaHc1     | : - - - - | -   |
| PmaHc2     | : - - - - | -   |
| TdoHx1     | : - - - - | -   |
| PmaHx1     | : - - - - | -   |
| PmaHx2     | : - - - - | -   |
| PmaHx3     | : - - - - | -   |
| PmaHx4     | : - - - - | -   |
| TbuHex1    | : - - - - | -   |
| LmiJHBP    | : - - - - | -   |
| BdiHex     | : - - - - | -   |
| PamHex12   | : - - - - | -   |
| Rc1CyanA   | : - - - - | -   |
| Rc1CyanB   | : - - - - | -   |
| TmoENP86   | : - - - - | -   |
| AgeHex     | : - - - - | -   |
| AgeHex2    | : - - - - | -   |
| TmoHex2    | : - - - - | -   |
| LdeDP1     | : - - - - | -   |
| AgrHex1    | : - - - - | -   |
| CfeHex2    | : NTMNL   | 750 |
| BheHex     | : - - - - | -   |
| GmeLHP82   | : - - - - | -   |
| HceRbH     | : - - - - | -   |
| TniAJHSP1  | : - - - - | -   |
| MseAry1a   | : - - - - | -   |
| MseAry1b   | : - - - - | -   |
| SliAry1    | : - - - - | -   |
| HceAry1    | : - - - - | -   |
| BmoSSP2    | : - - - - | -   |
| GmeAry1    | : - - - - | -   |
| CceHex2    | : - - - - | -   |
| CceHex2a   | : - - - - | -   |
| HceMTHF    | : - - - - | -   |
| SliMMRSP-A | : - - - - | -   |
| SliMMRSP-B | : - - - - | -   |
| HcuSP2     | : - - - - | -   |
| TniBJHSP2  | : - - - - | -   |
| PinSP1     | : - - - - | -   |
| TniBJHSP1  | : - - - - | -   |
| HcuSP1     | : - - - - | -   |
| MseMRSP    | : - - - - | -   |
| SliMRSP    | : - - - - | -   |
| BmoSSP1    | : - - - - | -   |
| HceMTHS    | : - - - - | -   |
| PinSP2     | : - - - - | -   |
| DmeLSP2    | : - - - - | -   |
| CviLSP2    | : - - - - | -   |
| MdoLSP2    | : - - - - | -   |
| AggHEX1    | : - - - - | -   |
| DmeLSP1a   | : - - - - | -   |
| DmeLSP1q   | : - - - - | -   |
| CviLSP1a   | : - - - - | -   |
| CviLSP1b   | : - - - - | -   |
| MdoLSP1    | : - - - - | -   |

**Alignment 4: Für die Neighbor-joining und Bayes-Stammbäume der Insekten verwendete Sequenzen.**

**Lebenslauf:**

Silke Hagner-Holler  
Hugo-Loersch-Str. 1  
55218 Ingelheim

Geboren am 15.09.1968 in Ingelheim am Rhein.

Staatsangehörigkeit: deutsch

**Schulausbildung:**

Schulabschluss mit dem Abitur 1986 an der Wilhelm-Leuschner-Schule in Mainz-Kastel.

**Studium und Hochschule:**

- Hochschulstudium an der TH-Darmstadt und der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Abschluss als Diplom-Biologin 1996.
- Von 1997 bis 2002 Promotion im Fachbereich Landwirtschaft an der Theodor-Heuss-Universität in Bonn / Landesanstalt für Pflanzenbau- und Pflanzenschutz in Mainz-Bretzenheim.
- Seit 2001 Promotion im Institut für molekulare Tierphysiologie der Johannes-Gutenberg-Universität.

**Sonstiges:**

1995-1997 Berufstätigkeit als Landwirtschaftlich-Technische Assistentin an der Landesanstalt für Pflanzenbau- und Pflanzenschutz in Mainz-Bretzenheim.