

Differentielle Expression und molekulare Evolution von Mollusken-Hämocyanin

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Klaus-Stephan Streit
geb. am 16.10.1975 in Bernkastel-Kues

Mainz, 2008

Inhaltsverzeichnis

A	EINLEITUNG	1
1.	Respiratorische Proteine.....	1
2.	Struktureller Aufbau der Mollusken-Hämocyanine.....	2
3.	Gastropoden-Hämocyanin.....	4
4.	Biosyntheseort des Hämocyanins.....	5
5.	Struktur der Mollusken-Hämocyanin-Gene.....	6
6.	Ziel der Arbeit	8
B	MATERIAL UND METHODEN	9
1.	Tiere.....	9
1.1	<i>Megathura crenulata</i>	9
1.2	Haliotidae	10
1.3	<i>Aplysia californica</i>	11
1.4	Polyplacophoren.....	12
2.	Chemikalien und Geräte.....	14
3.	Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	14
4.	Mikrobiologische Methoden.....	15
4.1	Bakterien, Phagen und Vektoren.....	15
4.2	Nährmedien und Agarplatten	16
4.3	Glycerinkulturen.....	17
4.4	Plattenkulturen	17
4.5	Flüssigkultur.....	17
4.6	MgSO ₄ -Kultur von Bakterienstämmen	18
4.7	Kompetente Bakterien.....	18
4.8	Transformation kompetenter Bakterien.....	19
5.	Allgemeine molekularbiologische Methoden	19
5.1	Präparation genomischer DNA	19
5.2	RNA-Präparation.....	19
5.2.1	Präparation von Gesamt-RNA	20
5.2.1.1	GITC-Methode	20
5.2.1.2	RNA-Präparation mittels Säulenaufreinigung	21
5.2.2	mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA	21
5.3	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	22

5.4	Nukleinsäurepräzipitation mit Alkohol	22
5.5	PCR-Techniken	23
5.5.1	Verwendete Primer	23
5.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23
5.5.3	Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin	25
5.5.4	GenomeWalker	26
5.5.5	RT-PCR	26
5.5.5.1	Qiagen OneStep RT-PCR	27
5.5.5.2	5'- RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	27
5.5.5.3	GeneRacer	27
5.6	Gelelektrophorese.....	28
5.6.1	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	28
5.6.2	Elektrophoretische Auftrennung von RNA im Agarosegel	29
5.7	Extraktion der DNA aus Agarosegelen	30
5.8	PCR-Aufreinigung	30
5.9	Isolierung von Plasmid-DNA	31
5.10	Restriktionsverdau.....	31
5.11	Klonierung.....	32
5.11.1	Blau-Weiß-Selektion	35
5.11.2	Letal-Gen-Selektion.....	35
5.12	Southern Blot.....	36
5.13	Erstellen einer genomischen DNA-Bank	38
5.13.1	Verdau der genomischen DNA.....	39
5.13.2	Ligation der <i>EcoRI</i> -Adapter	39
5.13.3	Verpackung der DNA	39
5.13.4	Titerbestimmung der Primärbank	40
5.13.5	Amplifikation der Primärbank	40
5.14	Screening einer genomischen Bank	41
5.15	<i>In vivo</i> -Excision.....	43
5.16	<i>In situ</i> -Hybridisierung	44
5.16.1	Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung	44
5.16.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	46
6.	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	48
7.	Sequenzanalyse	49
7.1	DNA-Sequenzierung	49
7.2	Sequenzauswertung am Computer	49

8. Allgemeine proteinbiochemische Methoden	50
8.1 Aufbereitung der Hämolymphe.....	50
8.2 Konzentrationsbestimmung und Absorptionsspektrum des Hämocyanins.....	50
8.3 Dissoziation des Mollusken-Hämocyanins in seine Untereinheiten	51
8.4 Eindimensionale elektrophoretische Auftrennung	51
8.4.1 SDS-PAGE	51
8.4.2 Native PAGE	52
8.4.3 Gelherstellung.....	53
8.5 Zweidimensionale Immunelektrophorese	55
9. EM-Aufnahmen	56
10. Chromosomenpräparation	57
C ERGEBNISSE.....	58
1. Sequenz- und Expressionsanalysen	58
1.1 Analysen zur Expression der Hämocyanine von <i>Haliotis asinina</i>	58
1.1.1 Biochemische Untersuchungen.....	59
1.1.2 Sequenzanalysen des <i>Haliotis asinina</i> -Hämocyanins.....	61
1.1.3 Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung	63
1.2 Untersuchungen zur cDNA, Genstruktur und chromosomalen Lokalisation von Gastropoden-Hämocyanin.....	69
1.2.1 Sequenzen und Genstrukturen der Hämocyanine KLH1 und KLH2.....	69
1.2.1.1 cDNA und Gen des KLH1	69
1.2.1.2 Der KLH2 Promotor beinhaltet eine TATA-Box.....	70
1.2.1.3 Chromosomale Lokalisation der KLH-Gene.....	71
1.2.2 HtH- und KLH-Gene sind strukturell identisch.....	74
1.2.2.1 HtH1-Gen besteht aus 17 Exons und 16 Introns.....	74
1.2.2.2 HtH2-Gen besitzt eine TATA-Box.....	74
1.2.3 Das <i>Aplysia californica</i> Hämocyanin-Gen ist im Vergleich zu den KLH- und HtH-Genen stark fragmentiert.....	76
2. Hämocyanin-Sequenzen als phylogenetischer Marker.....	81
2.1 Molekularphylogenetische Analyse der Gattung <i>Haliotis</i>	81
2.2 Molekularphylogenetische Analyse der Polyplacophoren.....	84
D DISKUSSION.....	88
1. Entwicklungsspezifische Expression der Hämocyanine von <i>Haliotis asinina</i>.....	88
2. Gen- und Sequenzanalysen.....	92
2.1 Analyse der für HtH und KLH kodierenden Sequenzen.....	92

2.2	Identifizierung des Transkriptionsstartpunkts von KLH2 und HtH2	94
2.3	Promotoren der Gene von KLH2 und HtH2 beinhalten eine TATA-Box	96
2.4	Vergleich der bisher bekannten Signalsequenzen von <i>Haliotis tuberculata</i> , <i>Megathura crenulata</i> , <i>Nautilus pompilius</i> , <i>Aplysia californica</i> , <i>Nucula nucleus</i> und <i>Octopus dofleini</i>	98
2.5	Chromosomenpräparationen an <i>Megathura crenulata</i> bestätigen KLH3	100
3.	Analyse des Hämocyanin-Gens von <i>Aplysia californica</i>	102
3.1	Die Genstruktur von <i>Aplysia californica</i> liefert Hinweise auf ursprüngliche interne Introns	102
3.2	Identifizierung der Sequenzen einer weiteren Isoform	109
4.	Molekulare Phylogenie und geographischer Ursprung der Haliotidae	111
5.	Molekulare Phylogenie der Polyplacophoren	114
5.1	Lepidopleurida	115
5.2	Chitonida	116
5.2.1	Chitonida: Acanthochitonina	117
5.2.2	Chitonida: Chitonina	117
E	ZUSAMMENFASSUNG	118
F	ANHANG	120
1.	Abkürzungen	120
1.1	Allgemeine Abkürzungen	120
1.2	Abkürzungen der Hämocyanine	122
1.3	Abkürzungscodes der Aminosäuren	122
2.	IUPAC-Codes für degenerierte Nukleotide	122
3.	Verwendete Primer	123
4.	DNA-Sequenzdaten	125
4.1	Sequenzen des <i>Megathura crenulata</i> -Hämocyanins (KLH)	125
4.1.1	KLH1	125
4.1.2	KLH2	129
4.2	Sequenzen des <i>Haliotis tuberculata</i> -Hämocyanins (HtH)	131
4.2.1	HtH1	131
4.2.2	HtH2	131
4.3	Sequenzen des <i>Aplysia californica</i> -Hämocyanins (AcH)	132
4.3.1	AcH1-Sequenzen aus der Gendatenbank	132
4.3.2	AcH2-Sequenzen aus der Gendatenbank	146

4.3.3	Vergleich der Aminosäuresequenzen von AcH1 und AcH2	149
4.3.4	Über gPCR amplifizierte AcH-Sequenzen	152
4.3.5	NCBI-Trace Archive TI-Nummern (Accession-Number) der Gensequenzen des <i>Aplysia californica</i> -Hämocyanins.....	155
4.4	Sequenzen der <i>Haliotidae</i>	156
4.5	Sequenzen der Polyplacophoren	159
4.5.1.	Genomische Sequenzen der FU-f bis FU-g	159
4.5.2.	Sequenzen der FU-d.....	167
5.	Internet-Adressen.....	168
G	LITERATUR	169
	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	185

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktureller Aufbau eines Mollusken-Hämocyanins	3
Abb. 2: TEM-Aufnahme der <i>Megathura crenulata</i> Hämocyanine KLH1 und KLH2	5
Abb. 3: Das Hämocyanin von <i>H. tuberculata</i> wird in den Rhogozyten synthetisiert.....	6
Abb. 4: Genstrukturen der Hämocyanine KLH1, KLH2, HtH1, HtH2, NpH und OdH _G	7
Abb. 5: <i>Megathura crenulata</i>	9
Abb. 6: <i>Haliotis tuberculata</i>	10
Abb. 7: <i>Aplysia californica</i>	11
Abb. 8: <i>Tonicella lineata</i>	12
Abb. 9: Verwendete Marker.....	29
Abb. 10: Pipettierschema eines Restriktionsverdaus	32
Abb. 11: pCR-2.1-TOPO-Klonierungsvektor	33
Abb. 12: pCR-XL-TOPO-Klonierungsvektor.....	33
Abb. 13: StrataClone PCR Klonierungsvektor pSC-A	34
Abb. 14: pGEM-T Easy Klonierungsvektor	34
Abb. 15: Southern Blot-Apparatur	38
Abb. 16: Quantitative Analyse isoformspezifischer Hämocyanin-mRNA	59
Abb. 17: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme von HaH	60
Abb. 18: HaH im SDS-Gel und in nativer PAGE	60
Abb. 19 : Crossed-Immunelektrophorese von aufgereinigtem HaH.....	61
Abb. 20: Phylogenetische Beziehungen der <i>Haliotis</i> Hämocyanin-Gene.....	62
Abb. 21: Hämocyanin-Expression während der Larvalentwicklung	65
Abb. 22: <i>Haliotis</i> Bauplan.....	66
Abb. 23: Expression von HaH1 und HaH2 in ein Monat alten juvenilen Tieren	68
Abb. 24: Schematische Darstellung der KLH1-cDNA	70
Abb. 25: Giemsa- und CMA ₃ -Färbung von mitotischen Chromosomen.....	72
Abb. 26: Chromosomen in der Metaphase-I der Meiose	72
Abb. 27: Schematische Darstellung eines KLH-Gens	73
Abb. 28: Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierungen mit isoformspezifischen Sonden.....	74
Abb. 29: Genstrukturvergleich zwischen KLH und HtH.....	75
Abb. 30: Genstruktur des Hämocyanins von <i>Aplysia californica</i>	78
Abb. 31: Introneigenschaften des <i>Aplysia californica</i> -Hämocyanin-Gens.....	79
Abb. 32: Genarchitektur und Sequenzalignment der verschiedenen <i>Haliotis</i> -Arten.....	82
Abb. 33: Phylogenie der Haliotidae	83
Abb. 34: Phylogenie der Polyplacophoren.....	87

Abb. 35: Alignment der Leadersequenzen.....	96
Abb. 36: Alignment einer Teilsequenz der Promotoren und 5'UTR der KLH2- und HtH2- Gene.....	97
Abb. 37: Vergleich der Hämocyanin-Signalpeptide.....	98
Abb. 38: Alignment der Signalsequenzen.....	99
Abb. 39: Multipler Sequenzvergleich der Hämocyanin-Gene.....	109
Abb. 40: Ursprung und Verbreitung der Haliotidae.....	113
Abb. 41: Das Alignment des C-terminalen Bereichs der FU-f weist bei den Chitonida eine Deletion auf.....	115
Abb. 42: Klon „KLH1 5'UTR-a”.....	125
Abb. 43: Die zusammengefügte KLH1-Gensequenzen.....	129
Abb. 44: Klon „KLH2-2/3b-4”.....	130
Abb. 45: Klon „HtH1/5”.....	131
Abb. 46: Klon „HtH2/5'-a”.....	131
Abb. 47: Klon „HtH2 Promotor N1”.....	131
Abb. 48: Klon „HtH2/9”.....	132
Abb. 49: Genomische Sequenz des Ach1 von dem Intron UTR1/2 bis ins Intron d1/2.....	138
Abb. 50: Genomische Sequenz des Ach1 von dem Intron d2/3 bis ins Exon d4.....	141
Abb. 51: Genomische Sequenz des Ach1-Gens von dem Intron f3/4 bis Ende 3'UTR.....	145
Abb. 52: Genomische Sequenz des Ach2-Gens von dem Intron c5/6 bis ins Intron c6/7....	146
Abb. 53: Genomische Sequenz des Ach2-Gens von dem Intron c/d bis ins Exon e1.....	148
Abb. 54: Genomische Sequenz des Ach2-Gens von dem Intron f1/2 bis ins Intron f3/4.....	148
Abb. 55: Genomische Sequenz des Ach2-Gens von dem Intron g5/6 bis ins Intron h2/3....	149
Abb. 56: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons c6 von Ach1 und Ach2.....	149
Abb. 57: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons d1 von Ach1 und Ach2.....	149
Abb. 58: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons d2 von Ach1 und Ach2.....	149
Abb. 59: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons d3 von Ach1 und Ach2.....	150
Abb. 60: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons d4 von Ach1 und Ach2.....	150
Abb. 61: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons d5 von Ach1 und Ach2.....	150
Abb. 62: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons d6 von Ach1 und Ach2.....	150
Abb. 63: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons e1 von Ach1 und Ach2.....	150
Abb. 64: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons f2 von Ach1 und Ach2.....	151
Abb. 65: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons f3 von Ach1 und Ach2.....	151
Abb. 66: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons g6 von Ach1 und Ach2.....	151
Abb. 67: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons h1 von Ach1 und Ach2.....	151
Abb. 68: Alignment der Aminosäuresequenzen des Exons h2 von Ach1 und Ach2.....	151
Abb. 69: Klon „Aplysia A1” umfasst die Gensequenz von dem Exon b1 bis b2.....	152

Abb. 70: Klon „Aplysia F13 MP6” umfasst die Gensequenz von dem Exon b1 bis b3	152
Abb. 71: Klon „Aplysia D3/4” umfasst die Gensequenz von dem Exon d3 bis d4.....	153
Abb. 72: Klon „Aplysia G1” umfasst die Gensequenz vom Exon d4 bis ins Intron d4/5	153
Abb. 73: Klon „Aplysia H” umfasst die Gensequenz von dem Intron d/e bis ins Exon e1 ...	154
Abb. 74: Klon „Aplysia I” umfasst die Gensequenz von dem Exon e1 bis ins Intron e1/2...	154
Abb. 75: Klon „Aplysia K” umfasst eine Genteilsequenz der 3’UTR.....	154

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: cDNA-Fragmente des HaH.....	61
Tab. 2: Prozentuale Identitäten der f/g-Teilsequenzen beider Hämocyanin-Isoformen von <i>Haliotis</i>	62
Tab. 3: PCR-Produkte und Klone des KLH.....	71
Tab. 4: Digoxigenin markierte DNA-Sonden für die FISH	73
Tab. 5: PCR-Produkte und Klone des HtH	76
Tab. 6: PCR-Produkte und Klone des AcH.....	77
Tab. 7: Identitätsvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen	80
Tab. 8: PCR-Produkte und Klone der analysierten Polyplacophoren-Arten	85
Tab. 9: „Codon-Usage“-Analyse der KLH- und HtH-DNA	93
Tab. 10: „FU-übergreifende“ Konservierung der internen Introns	105
Tab. 11: Sequenzvergleich der Protosplice Stellen.....	106

A EINLEITUNG

1. Respiratorische Proteine

Vielzellige Organismen haben im Laufe der Evolution verschiedene Strategien entwickelt, um ihre Zellen mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Kleine Tiere, die ein großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis aufweisen, können durch Diffusion die Sauerstoffversorgung der Zellen gewährleisten. Durch die Evolution von sauerstofftransportierenden Proteinen in Verbindung mit Kreislaufsystemen konnten aber auch komplexere Vielzeller entstehen, deren Größe nicht mehr durch die Diffusionswege des Sauerstoffs limitiert wurde. Diese respiratorischen Blutproteine besitzen die Fähigkeit, Sauerstoff mittels Eisen- oder Kupferionen reversibel zu binden. Sie lassen sich in drei Klassen einteilen: Hämoglobin, Hämerythrin und Hämocyanin.

Hämoglobine kommen sowohl intra- als auch extrazellulär nahezu überall im Tierreich vor. Der Sauerstoff wird hierbei über einen Eisen-Porphyrinring gebunden, der über mehrere konservierte Histidine (Lieb et al., 2006) oder auch Glutamine (Royer et al., 2001) komplexiert ist. Hämerythrine besitzen keinen Porphyrinring, sondern binden den Sauerstoff mit Hilfe zweier Eisenionen, die direkt über die Primärstruktur komplexiert sind. Sie kommen bei marinen Anneliden und einigen kleineren wurmförmigen Tieren vor (Mangum, 1992). Die dritte Gruppe der respiratorischen Proteine bilden die kupferhaltigen Hämocyanine vieler Arthropoden und Mollusken. Aufgrund der strukturellen Unterschiede werden die Hämocyanine dieser beiden Tierstämme jedoch als konvergent entstandene Proteinfamilien angesehen (Markl & Decker, 1992; van Holde & Miller, 1995; Decker & Terwilliger, 2000; Burmester, 2001; Lieb et al., 2001; van Holde et al., 2001).

Hämocyanine sind extrazelluläre, in der Hämolymphe kolloidal gelöste Glykoproteine, die den Sauerstoff reversibel an zwei Kupferatome binden, die im aktiven Zentrum lokalisiert sind (Abb. 1) (Decker et al., 2007). Dadurch wird dem Atmungspigment im oxygenierten Zustand seine charakteristische blaue Färbung verliehen (Markl et al., 1991; van Holde & Miller, 1995).

2. Struktureller Aufbau der Mollusken-Hämocyanine

Mollusken- und Arthropoden-Hämocyanine weisen gemeinsame funktionelle Eigenschaften auf und zeigen auch in ihren Kupferbindungsstellen gewisse Ähnlichkeiten (Cuff et al., 1998; Perbandt et al., 2003). Strukturell jedoch divergieren sie sehr stark. Sie unterscheiden sich grundlegend in ihrer Primär-, Tertiär- und Quartärstruktur (Markl & Decker, 1992; van Holde & Miller, 1995). Aufgrund dessen werden sie in zwei getrennte Hämocyanin-Superfamilien unterteilt (Burmester, 2001).

Arthropoden-Hämocyanine sind globuläre Glykoproteine, die sich aus einem Hexamer bzw. mehreren Hexameren zusammensetzen. Die hexamere Grundeinheit, welche aus identischen oder ähnlichen Monomeren (ca. 75 kDa) aufgebaut ist, kann zu unterschiedlichen Quartärstrukturen assoziieren, die bis zu acht Hexamere umfassen können, wobei jede Untereinheit ein Sauerstoffmolekül reversibel binden kann (Martin et al., 2007).

Im Stamm der Mollusken wurde Hämocyanin bisher hauptsächlich in Käferschnecken (Polyplacophoren), Schnecken (Gastropoden), Tintenfischen (Cephalopoden) und in einigen wenigen Muscheln (Bivalvia) nachgewiesen (Herskovits, 1988; Altenhein et al., 2002; Streit, 2002; Lieb et al., 2004; Bergmann et al., 2006, 2007). Mollusken-Hämocyanine setzen sich aus einzelnen Monomeren zusammen, die aus einer Polypeptidkette von 350 bis 400 kDa bestehen und sich in sieben bis acht globuläre funktionelle Domänen (functional units, FUs) unterteilen lassen (Abb. 1 C) (Lieb et al., 2001). Diese werden vom N-terminalen Ende her mit FU-a bis FU-h bezeichnet und sind über Linker-Peptide von 10 bis 15 Aminosäuren perlschnurartig miteinander verbunden (Lang, 1988; Lang & van Holde, 1991).

Trotz dieser einheitlichen Grundstruktur weisen die Mollusken-Hämocyanine deutliche Unterschiede auf. Die Hämocyanin-Untereinheiten der Schnecken und Muscheln besitzen acht FUs (a-h) und bilden hauptsächlich Didekamere mit einer relativen Molekülmasse von 8 Millionen Dalton aus. Cephalopoden-Hämocyanine bilden ausschließlich Dekamere (Cuff et al., 1998; Gatsogiannis et al., 2007), wobei deren Untereinheiten aus sieben FUs wie bei *Octopus dofleini* (Miller et al., 1998), oder aus acht FUs wie bei *Sepia officinalis* (Declercq et al., 1990; Vanderzande et al., 1990; Gielens, 2000) bestehen können. Dadurch bedingt variieren die relativen Molekülmassen zwischen 3,5 und 4 Millionen Dalton.

Innerhalb einer FU können anhand röntgenkristallographischer Untersuchungen zwei strukturelle Domänen unterschieden werden, die „core“-Domäne und die „ β -Sandwich“-Domäne (Abb. 1 D) (Cuff et al., 1998; Perbandt et al., 2003). Die „core“-Domäne umfasst hauptsächlich α -helikale Bereiche und ist für die Bindung des Sauerstoffs verantwortlich. Die reversible Sauerstoffbindung erfolgt hierbei über zwei Kupferionen (Cu-A und Cu-B), die an

je drei Histidinreste gebunden sind (van Holde et al., 1992; Cuff et al., 1998; Miller et al., 1998) (Abb. 1). Die „ β -Sandwich“-Domäne weist eine große Anzahl an β -Faltblattstrukturen auf und ist vermutlich für die Stabilität der FU und die Assemblierung der Untereinheiten verantwortlich.

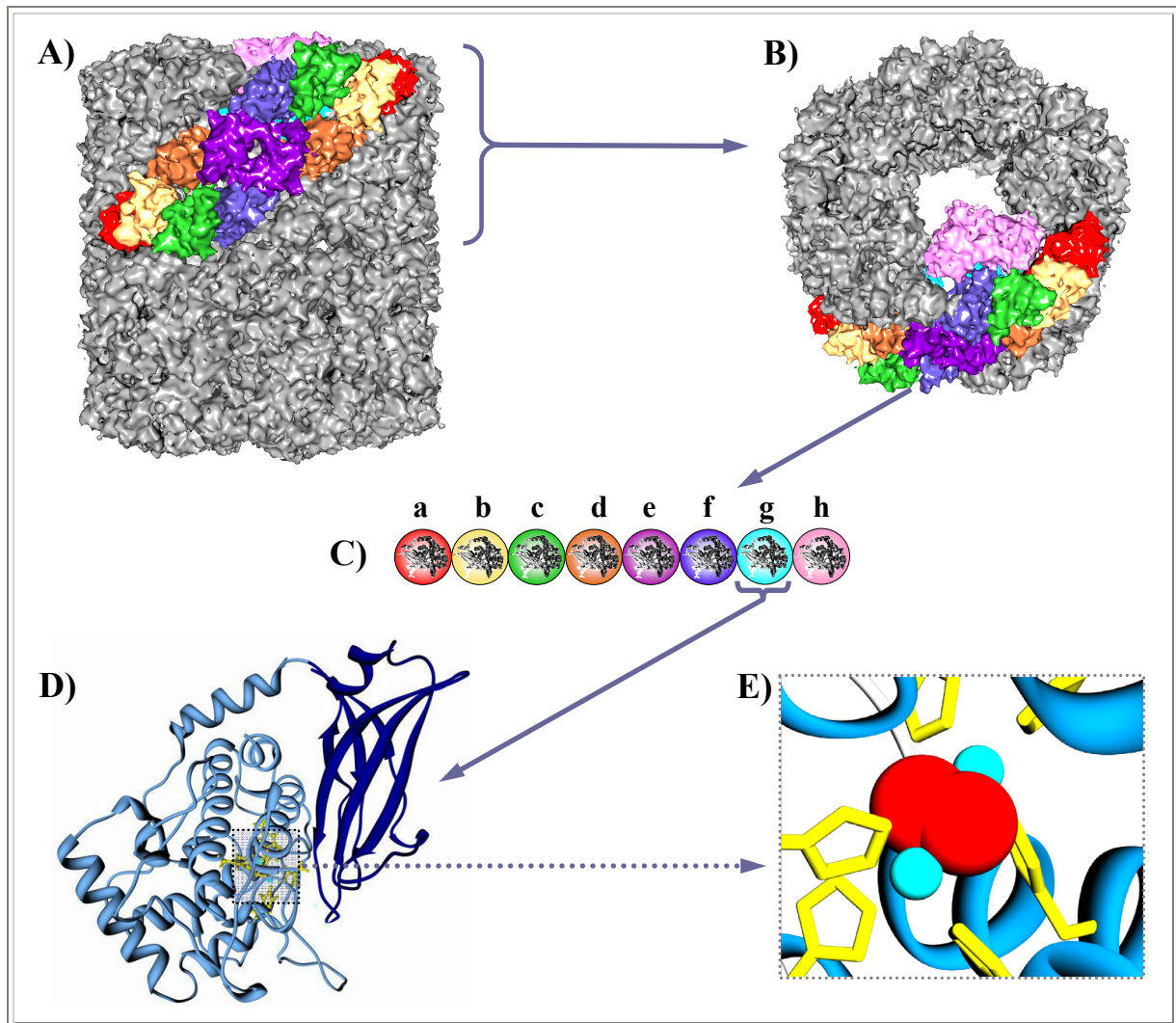


Abb. 1: Struktureller Aufbau eines Mollusken-Hämocyanins

A) 3D-Rekonstruktion der Quartärstruktur eines Hämocyanin-Didekamers von *Megathura crenulata* in der Seitenansicht, bzw. B) eines Dekamers in gekippter Ansicht (Ch. Gatsogiannis, AG Markl; unveröffentlicht). C) Schematische Darstellung der FUs (a-h). D) Röntgenstruktur der FU-g des OdH (*Octopus dofleini* Hämocyanin, nach Cuff et al., 1998). Die α -helikalen Bereiche sind hellblau dargestellt, β -Faltblattstrukturen sind dunkelblau markiert. Im Zentrum ist die Kupferbindungsstelle erkennbar. E) Kupferbindungszentrum der Hämocyanine. Zwei Cu^{2+} -Ionen (cyan), die über sechs Histidine (gelb) komplexiert werden, können ein O_2 -Molekül (rot) reversibel binden.

Das aktive Zentrum der Mollusken-Hämocyanine ähnelt dem der Tyrosinasen (van Gelder et al., 1997) und Catechol-Oxidase (Klabunde et al., 1998). Diese drei Enzyme werden aufgrund ihres binukleären Kupferbindungszentrums zu den Typ-3-Kupferproteinen zusammengefasst (Gerdemann et al., 2002). Die Verwandtschaft von Tyrosinasen, Catechol-

Oxidasen und Mollusken-Hämocyaninen wird unter anderem auch durch eine Analyse der dreidimensionalen Struktur einer Catechol-Oxidase aus der Tomate ersichtlich (Gerdemann et al., 2002). Evolutiv sind Tyrosinasen und Hämocyanine jedoch sehr weit voneinander getrennt und zeigen stark unterschiedliche Evolutionsraten.

3. Gastropoden-Hämocyanin

Die Gastropoden-Hämocyanine bilden in der Quartärstruktur hauptsächlich Didekamere (Abb. 2). Die Zylinderwand der Dekamere wird aus den FUs abcdef gebildet, wohingegen die Kragenregion von den Domänen FU-g und FU-h geformt wird (Lieb et al., 1999; Meissner et al., 2000). Der Kragen ist peripher angeordnet, was zur Ausbildung eines asymmetrischen Dekamers mit einer Kragenseite und einer offenen Seite führt (Harris et al., 1992; Orlova et al., 1997; Meissner et al., 2000, 2007). Bei der Entstehung der Didekamere lagern sich zwei Dekamere mit ihren offenen Seiten zusammen (Herskovits & Hamilton, 1991; Markl et al., 1991). Bei einigen marinen Gastropoden tauchen zudem tubuläre Multidekamere auf. Diese entstehen dadurch, dass sich weitere Dekamere von beiden Seiten an ein zentrales Didekamer anlagern (Terwilliger et al., 1988; Herskovits & Hamilton, 1991; Markl et al., 1991, 2001; Harris et al., 1992; van Holde et al., 1992; Gebauer et al., 1994; Lieb et al., 2004).

Innerhalb der Gastropoden-Hämocyanine findet man je nach Spezies unterschiedliche Anzahlen an Isoformen. Während für *Aplysia californica* bislang nur eine Hämocyanin-Isoform identifiziert werden konnte (Herskovits et al., 1995; Lieb et al., 2004), besitzen *Haliotis tuberculata* (Keller et al., 1999; Lieb et al., 1999) und die entfernter verwandte *Rapana thomasiana* (Boteva et al., 1991; Idakieva et al., 1993; Gebauer et al., 1999) zwei Typen von Untereinheiten. Bei der Schlüssellochschncke (Keyhole Limpet) *Megathura crenulata* geht man sogar von drei Isoformen aus (Hanisch, 2007). Im Vergleich weisen die Isoformen unterschiedlich hohe Sequenzidentitäten auf. Die Hämocyanin-Isoformen 1 und 2 von *M. crenulata* (KLH1 und KLH2, abgeleitet von Keyhole Limpet Hemocyanin) sind beispielsweise nur zu 65% identisch (Lieb et al., 2000), während die Isoformen 2 und 3 eine Sequenzidentität von mehr als 85% zeigen (Hanisch, 2007).

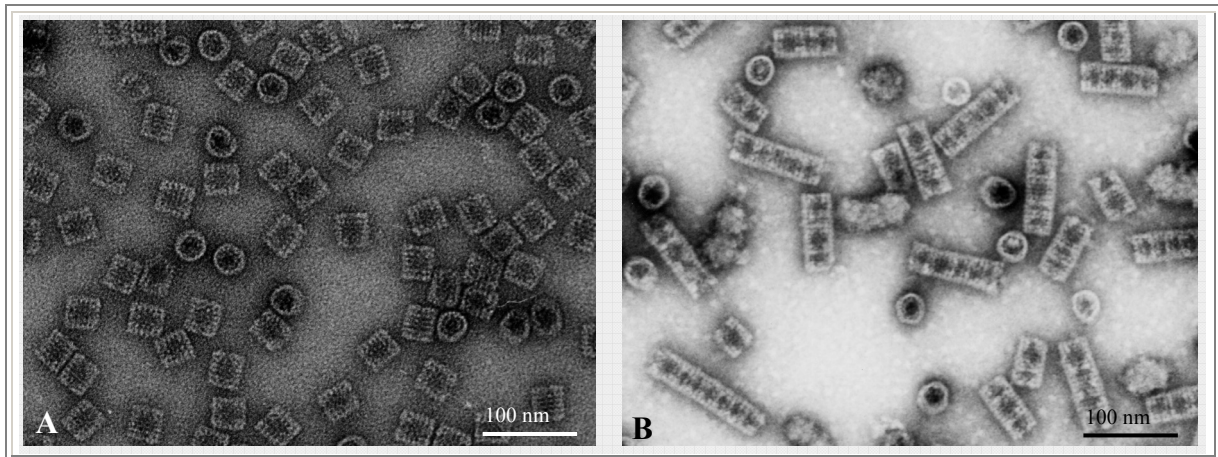


Abb. 2: TEM-Aufnahme der *Megathura crenulata* Hämocyanine KLH1 und KLH2

A) KLH1 formt in vivo hauptsächlich Didekamere. B) KLH2 bildet neben Didekamern auch Multidekamere (Harris et al., 1997).

Bei *H. tuberculata* und *M. crenulata* lassen sich die Isoformen 1 und 2 sowohl biochemisch als auch immunologisch voneinander unterschieden (Keller et al., 1999). In vivo treten die zwei Isoformen der beiden Gastropoden-Arten in unterschiedlichen Mengenverhältnissen in der Hämolymphe auf. Über die funktionellen Unterschiede dieser beiden Hämocyanin-Isoformen ist nichts bekannt. Bei *M. crenulata* wurde beobachtet, dass KLH1 bei gehälterten Tieren nach einigen Monaten vollständig abgebaut wird, und lediglich KLH2 in der Hämolymphe erhalten bleibt (Markl et al., 1991; Gebauer et al., 1994). Zudem bildet KLH2 in vivo Multidekamere aus (Abb. 2), wohingegen KLH1 nahezu ausschließlich zu Didekamern aggregiert (Abb. 2) (Harris und Markl, 1992). Worauf die unterschiedlichen Assemblierungseigenschaften, Expressionsraten und Halbwertszeiten beruhen, ist weitgehend unbekannt. Die Beobachtungen deuten allerdings auf unterschiedliche physiologische Aufgaben der beiden Isoformen hin.

4. Biosyntheseort des Hämocyanins

Innerhalb der Mollusken wurden unterschiedliche Biosyntheseorte des Hämocyanins identifiziert. Bei der marinen Schnecke *Haliothis tuberculata* wird das Hämocyanin in Zellen synthetisiert, die aufgrund ihrer Oberflächenstruktur als Porenzellen oder Rhogozyten bezeichnet werden (Haszprunar, 1996; Albrecht et al., 2001) (Abb. 3). Bei den charakteristischen Poren der Rhogozyten handelt es sich um vesikuläre Einstülpungen der Plasmamembran. Sie sind besonders häufig im Bereich der Mitteldarmdrüse lokalisiert, kommen aber auch verstreut im gesamten Bindegewebe vor (Albrecht et al., 2001). Innerhalb

der Cephalopoden wurden unterschiedliche Syntheseorte identifiziert. Das Hämocyanin von *Octopus dofleini* wird in den Branchialdrüsen produziert, wohingegen bei *Nautilus pompilius* die Synthese in der Mitteldarmdrüse stattfindet (van Holde & Miller, 1995). Untersuchungen an *Sepia officinalis* zeigten, dass das Hämocyanin in embryonalen Blutzellen und in Zellen der Branchialdrüsen, Branchialherzen sowie der Mitteldarmdrüse synthetisiert wird (Beuerlein et al., 2000; 2004).

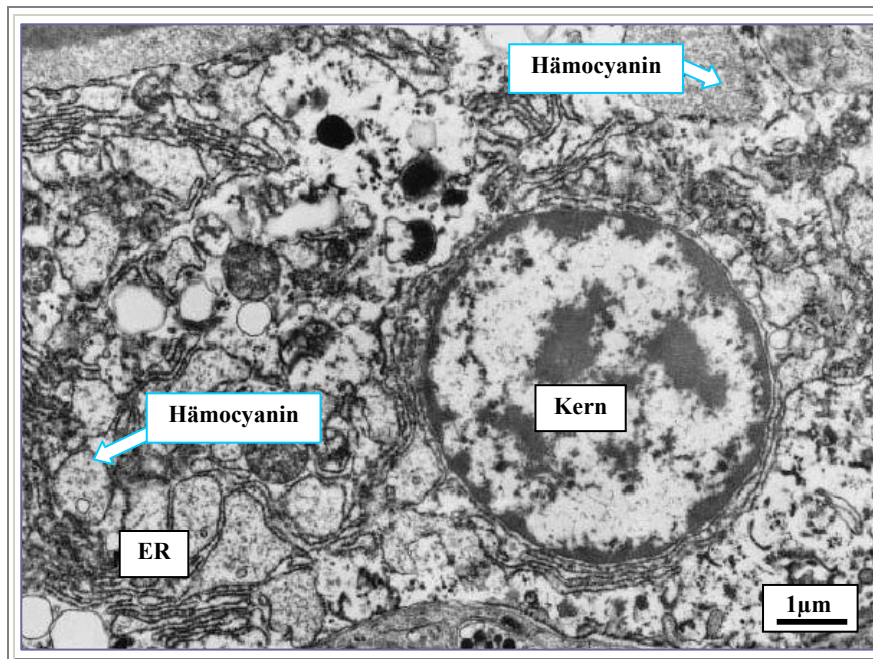


Abb. 3: Das Hämocyanin von *H. tuberculata* wird in den Rhogozyten (Porenzellen) synthetisiert.

Rhogozyten treten gehäuft im Bindegewebe des Mantels sowie der Mitteldarmdrüse auf. Aufgrund der identifizierten Signalsequenzen vermutet man, dass Hämocyanin am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) in das ER-Lumen translatiert wird und von dort in große Zisternen im Bereich des Trans-Golgi-Komplexes gelangt. Wie das Hämocyanin in die Hämolymphe geschleust wird, ist noch nicht geklärt (nach Albrecht et al., 2001).

5. Struktur der Mollusken-Hämocyanin-Gene

Ein Vergleich der Hämocyanin-Genstrukturen zwischen Gastropoden (*Megathura crenulata*, *Haliotis tuberculata*) und Cephalopoden (*Octopus dofleini*, *Nautilus pompilius*) zeigt, dass der Grundaufbau der Gene auch über die jeweiligen Molluskenklassen hinaus sehr ähnlich ist (Abb. 4). Die sieben bzw. acht FUs werden durch Linker-Introns getrennt (Lieb et al., 2001). Die Linker-Introns aller sequenzierten Mollusken-Hämocyanin-Gene liegen in Phase 1 und befinden sich zwischen den Exons zweier benachbarter Domänen. Die Aufrechterhaltung der Phase und Position der Linker-Introns lässt vermuten, dass es sich um sehr „ursprüngliche“ Introns handelt, die bereits vor der Radiation der Molluskenklassen existierten (Lieb et al., 2001). Neben diesen konservierten Linker-Introns treten auch interne Introns auf, die den kodierenden Bereich einer kompletten FU in mehrere Exons unterteilen. Im Gegensatz zu den Linker-Introns sind diese nicht auf bestimmte Positionen festgelegt und kommen in allen drei

Phasen vor. Auch die Anzahl an internen Introns ist bei den verschiedenen Mollusken-Hämocyanin-Genen unterschiedlich. Da bislang in den Hämocyanin-Genen der unterschiedlichen Molluskenklassen keine konservierten internen Introns identifiziert wurden, geht man davon aus, dass deren Insertion erst nach der Trennung der Klassen stattgefunden hat. Ein dritter Typ von Introns inseriert innerhalb der für das Signalpeptid kodierenden Sequenz, zwischen dieser und der FU-a und innerhalb der 3'UTR.

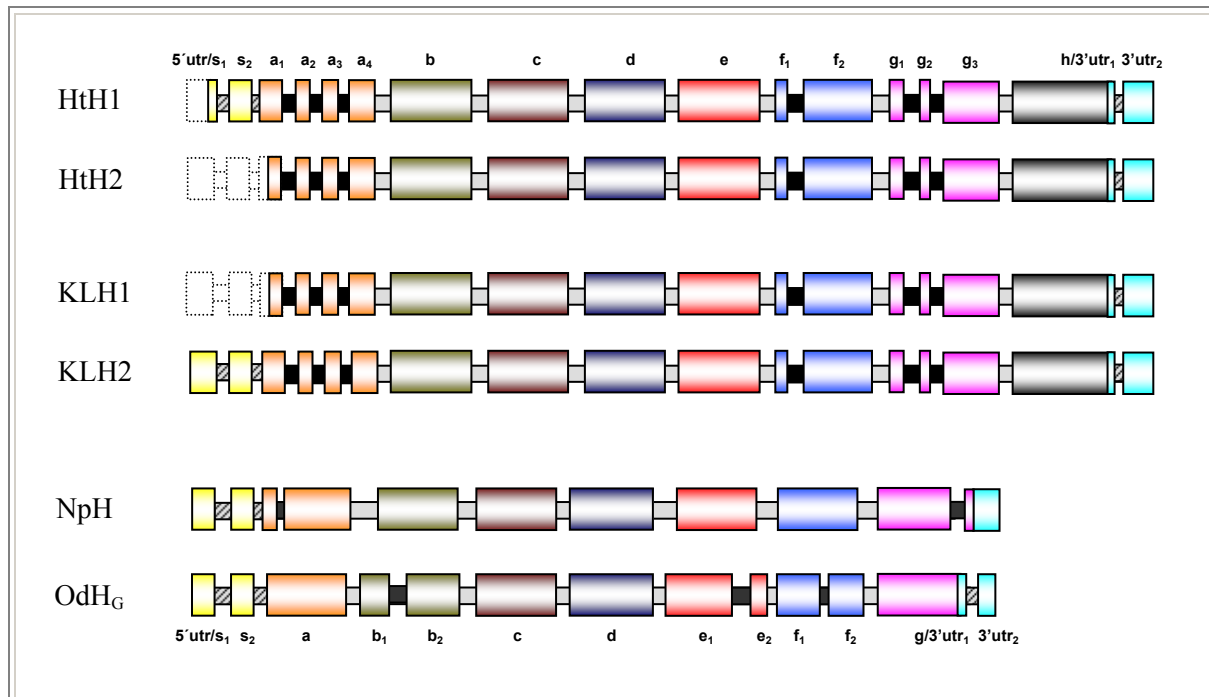


Abb. 4: Genstrukturen der Hämocyanine KLH1, KLH2, HtH1, HtH2, NpH und OdHG im Vergleich

Die Genstrukturen der Isoformen 1 und 2 des KLH (*M. crenulata*) sowie des HtH (*H. tuberculata*) stimmen überein. Zu den Hämocyanin-Genen von *O. dofleini* (OdHG) und *Nautilus pompilius* (NpH) sind sie in Bezug auf die Lage der „Phase1“-Linker-Introns nahezu identisch (graue Balken). Sie unterscheiden sich lediglich in Anzahl und Lage der internen Introns (schwarze Balken). Introns, die in den für Signalpeptide kodierenden Sequenzen oder in den UTR inserieren, sind grau-schwarz gestreift dargestellt. Die weißen Blöcke kennzeichnen Genbereiche, die zu Beginn dieser Arbeit noch nicht sequenziert waren. Kodierende Bereiche sind den jeweiligen FUs entsprechend farbig unterlegt.

6. Ziel der Arbeit

In *Megathura crenulata* und *Haliotis tuberculata* werden jeweils zwei immunologisch unterscheidbare Hämocyanin-Isoformen exprimiert, die in unterschiedlichen Mengen in der Hämolymphe nachweisbar sind (Markl et al., 1991; Gebauer et al., 1994; Keller et al., 1999). Ein Ziel meiner Doktorarbeit war die Aufklärung der Expressionskontrolle des Hämocyanins von *M. crenulata* und *H. tuberculata*. In diesem Zusammenhang sollten die Sequenzierungen der cDNA- und Gen-Bereiche von KLH1 (*M. crenulata*) sowie HtH1 und HtH2 (*H. tuberculata*) vervollständigt werden. Weiterführend sollten die Promotorbereiche der HtH- und KLH-Gene analysiert und charakterisiert werden. Durch diese Sequenzanalysen sollten regulatorische Bereiche identifiziert werden, die Hinweise auf Kontrollmechanismen der Transkription und Prozessierung der mRNA liefern.

Bisher ist nicht bekannt, ob die zwei Isoformen des Hämocyanins in ein- und demselben Zelltypen exprimiert werden, und ob diese Zelltypen aus denselben Vorläuferzellen hervorgehen. Expressionsanalysen an Larven verschiedener Entwicklungsstadien sollten Aufschluss über die Determination und Wanderung hämocyaninexprimierender Zellen geben und klären, in welchem Entwicklungsstadium die Expression der Hämocyanine in diesen Zellen angeschaltet wird.

Neben diesen funktionellen Studien sollen weiterführende phylogenetische Untersuchungen innerhalb der Familie der Haliotidae und in der Klasse der Polyplacophoren durchgeführt werden. Hierzu sollten genomische Teilbereiche des Hämocyanin-Gens verschiedener Arten der Gattung *Haliotis* bzw. der Polyplacophoren sequenziert und ausgewertet werden. Ziel dieser Analyse war es, die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Haliotidae und Polyplacophoren auf Grundlage von Hämocyanin-Sequenzen weiter aufzulösen und dadurch zu belegen, dass Hämocyanin als phylogenetischer Marker geeignet ist.

B MATERIAL UND METHODEN

1. Tiere

Der Stamm der Mollusken teilt sich in zwei Unterstämme: die Aculifera (Mollusken mit nadelartigen Fortsätzen; Stachelweichtiere) und die Conchifera (Mollusken mit einer echten Schale; Schalenweichtiere). Die in dieser Arbeit untersuchten Mollusken-Klassen repräsentieren beide Unterklassen. Die Gastropoden werden den Conchifera, die Polyplacophoren den Aculifera zugeordnet.

1.1. *Megathura crenulata*

Die marine Mollusken-Art *Megathura crenulata* (große kalifornische Schlüssellockschnecke) lässt sich innerhalb der Klasse der Gastropoden in die Unterklasse der Prosobranchia einordnen. In der Ordnung der Archaeogastropoden gehört sie zur Familie der Fissurellidae (Schlüssellockschnecken).



Abb. 5: *Megathura crenulata* (Bildquelle: Kai Büchler)

Der natürliche Lebensraum von *M. crenulata* erstreckt sich entlang der Pazifikküste von Südkalifornien bis Mexiko. Als nachtaktiver Weidegänger lebt sie in der unteren Gezeitenzone zwischen 3 und 12 Metern Tiefe auf felsigem Grund. Schlüssellockschnecken ernähren sich von Algen und Tunikaten. Sie verdanken ihren Namen einem Loch in der

Schale, dem Apikalsinus. Er dient als Ausströmöffnung für verbrauchtes Atemwasser, Harn, Exkrememente und Geschlechtsprodukte. Ein weiteres Merkmal der Fissurellidae ist der über der Schale liegende Mantel. Die Färbung des Mantels reicht von schwarz bis zu einem hellen grau und kann auch getigert sein (Illingworth, 1902; Ziegenhorn & Thiem, 1925; Buchsbaum & Milne, 1960; Murdock & Vogel, 1978).

1.2. Haliotidae

Haliotis tuberculata und *Haliotis asinina* gehören innerhalb der Klasse der Gastropoden zur Unterklasse der Prosobranchia. In der Ordnung der Archaeogastropoden zählen sie zur Überfamilie der Pleurotomariacea (Paarkiemer), zu denen die Familie der Haliotidae gehört, deren einzige Gattung *Haliotis* darstellt.

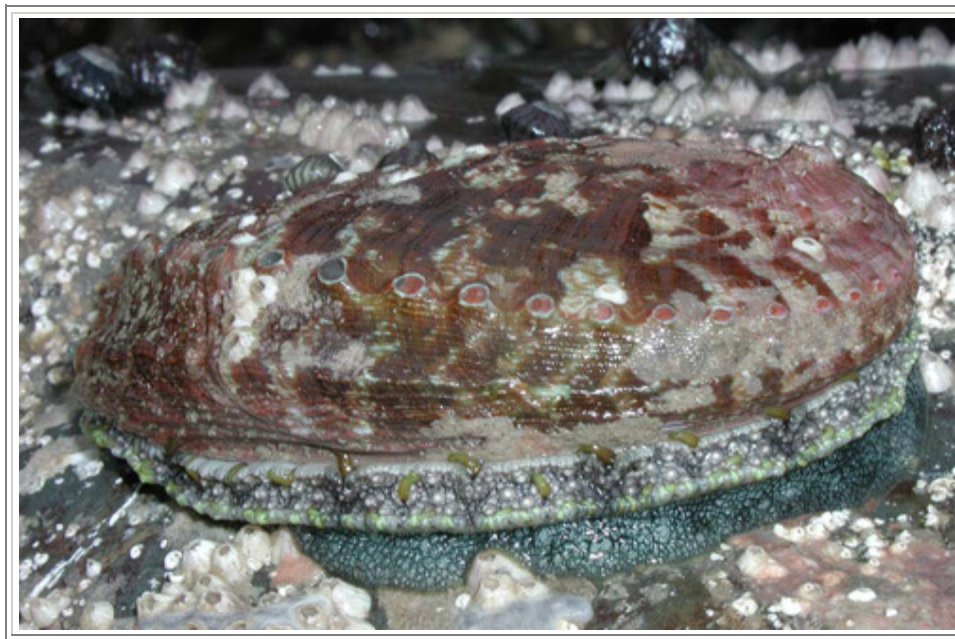


Abb. 6: *Haliotis tuberculata*

Als nachtaktive Weidegänger ernähren sich die beiden *Haliotis*-Arten von Makroalgen, die sie von Felsoberflächen abweiden. Die tropische Art *H. asinina* ist im gesamten Indopazifik verbreitet und bewohnt dort vornehmlich Korallenriffe. *H. tuberculata* lebt benthisch im Sublithoral und in der Flachwasserzone felsiger Küstenabschnitte. Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich vom Ärmelkanal bis hin zu den felsigen Küsten Großbritanniens, Frankreichs und der Kanalinseln. Vereinzelt ist *H. tuberculata* auch im Mittelmeer zu finden.

Die Larven und adulten Tiere der Art *H. asinina* wurden von Bernard Degnan (University of Queensland, Australien) im „Heron Island“-Riff gesammelt und zur Verfügung gestellt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere der Art *H. tuberculata*, die mir freundlicherweise von der Firma Biosyn (Fellbach) zur Verfügung gestellt wurden, stammten entweder aus Wildfängen von der französischen Atlantikküste oder aus einer Nachzucht der S. M. E. L. (Syndicat Mixte d'Équipement du Littoral, Blainville sur Mer, Frankreich). Die DNA von 10 weiteren Haliotidae (*H. midae*, *H. diversicolor*, *H. fulgens*, *H. cracherodii*, *H. wallalensis*, *H. gigantea*, *H. rufescens*, *H. corrugata*, *H. discus supertexta* und *H. discus hannai*) wurde von Victor Vacquier (University of California, San Diego, Scripps Institution of Oceanography, USA) bereitgestellt.

1.3. *Aplysia californica*

Systematisch wird die Gastropoden-Art *Aplysia californica* (kalifornischer Seehase) der Unterklasse der Opisthobranchia zugeteilt. Sie gehört zur Ordnung der Anaspidea und zur Familie der Aplysiidae.



Abb. 7: *Aplysia californica* (Bildquelle: http://www.uco-bn.fr/Galerie_Biologie/Fr-zoologie.htm)

Die Seehasen kommen in den warmen Gewässern der kalifornischen Pazifikküste in 8 bis 18 Metern Tiefe vor. Die beiden großen Fühler auf dem Kopf ähneln den Ohren eines Hasen,

was dem Tier seinen Namen einbrachte. Das Gehäuse ist nur noch rudimentär vorhanden und wird fast vollständig durch den Mantel bedeckt. Seehasen ernähren sich von Seegrass sowie von Rot-, Braun- und Grünalgen, deren Pigmente für die charakteristische Färbung der Tiere verantwortlich sind. In Stress- und Gefahrensituationen können sie eine violette, giftige Tinte absondern.

1.4. Polyplacophoren

Die Polyplacophoren (Käferschnecken), welche auch als Chitone bezeichnet werden, bilden eine Molluskenklasse, die sich stammesgeschichtlich wahrscheinlich sehr früh von den anderen Mollusken abgetrennt hat (Ivanov, 1996; Scheltema, 1996; Barucca et al., 2006). Sie werden dem Unterstamm der Aculifera zugeordnet.



Abb. 8: *Tonicella lineata* (Bildquelle: <http://www.ncrcn.org/me/projects/tidepool/linedchiton/linedchiton.html>)

Die etwa 900 rezenten, marinen Arten kommen hauptsächlich in den Brandungszonen der Meere vor, wobei einige Arten auch die Tiefsee bewohnen (Kaas et al., 1998). Ihr charakteristischer Panzer wird von acht überlappenden Calciumcarbonat-Platten gebildet. Er wird marginal von Kalkstacheln bzw. Kalkschuppen umrandet. Polyplacophoren ernähren sich hauptsächlich von tierischem und pflanzlichem Aufwuchs (z.B. Algen, Moostierchen und Hydrozoen).

Die DNA der untersuchten Polyplacophoren-Arten (*Lepitochitona cinerea*, *Nuttallina fluxa*, *Lorica volvox*, *Loricella angasi*, *Onithochiton hirasei*, *Cryptoplax iredalei*, *Nierstraszella lineata*, *Notoplax conica*, *Callochiton bouveti*, *Nuttallochiton mirandus*, *Plaxiphora aurata*, *Leptochiton alascensis*, *Tonicia chilensis*, *Stenosemus albus*, *Lepidozona interstincta* und *Hanleyella oldroydi*) wurde dankenswerterweise von Douglas Eernisse (California State University, USA) zur Verfügung gestellt.

2. Chemikalien und Geräte

Die Chemikalien wurden in Analysequalität von den Firmen Biomol (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Es wurden Petrischalen von Greiner (Frickenhausen) und Kunststoffröhrchen mit Schraubdeckel („Falcons“) von Falcon (Heidelberg) verwendet. Die Elektrophoresekammern stammten von der Firma Biotec Fischer (Reiskirchen) und Amersham Pharmacia (Modell 2117 Multiphor-Apparatur; Freiburg). Zur Auswertung von Agarosegelen wurden UV-Transilluminatoren mit den Wellenlängen 366 nm und 254 nm (Bachofer, Reutlingen) sowie 312nm (Vilber Lourmat, Eberhardzell) eingesetzt.

Sofern nicht abweichend beschrieben, erfolgten die Zentrifugationen in einer Mikroliter-Tischzentrifuge (Centrifuge 5417 R; Eppendorf, Hamburg). Für größere Volumina wurde eine kühlbare Megafuge 1.0 R (Heraeus, Fulda) oder eine Sorvall Kühlzentrifuge (RC5B; Du Pont Instruments, Bad Homburg) mit unterschiedlichen Rotoren benutzt. Zur Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen wurde die „Speed Vac Concentrater“-Zentrifuge (Bachofer, Reutlingen) eingesetzt. Die verwendeten Photometer waren ein „BioPhotometer“ (Eppendorf, Hamburg) sowie ein „Ultraspec Plus-Photometer“ (Pharmacia, Freiburg). Der eingesetzte Ultra-Turrax stammte von der Firma Jahnke & Kunkel (Staufen im Breisgau). Zum Sonifizieren wurde der Ultrahomogenisator „Labsonic 1510“ (B. Braun AG, Melsungen) benutzt. Die Schüttelwasserbäder stammten von der Firma Julabo (Seelbach). An entsprechenden Stellen im Text wird auf weitere verwendete Materialien hingewiesen.

3. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Für alle molekular- und mikrobiologischen Arbeiten wurden die verwendeten Geräte autoklaviert (1 bar Überdruck, 121°C, 30 min). Zum Ansetzen der Lösungen wurde entmineralisiertes und, wenn notwendig, autoklaviertes Wasser verwendet. Für Arbeiten mit RNA wurde bidestilliertes, mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltes Wasser sowie gestopfte Pipettenspitzen und Latex-Handschuhe verwendet, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden. Beim Umgang mit Ethidiumbromid wurden Handschuhe aus Nitril benutzt.

4. Mikrobiologische Methoden

4.1 Bakterien, Phagen und Vektoren

- **Bakterienstämme** (chemisch kompetent)

E. coli XL1-blue MRF' (Stratagene)

E. coli XL0LR (Stratagene)

E. coli Top 10[®] (Invitrogen)

E. coli StrataClone[™] SoloPack Competent Cells (Stratagene)

E. coli JM109 Competent Cells, High Efficiency (Promega)

- **Phagen**

λ -Phage (Stratagene)

Ex Assist[™] Helper Phage (Stratagene)

- **Vektoren**

pGEM-T Easy[™] (Promega): 3 kb; Ampicillin-Resistenz; multiple cloning site;
lacZ α -Gen

StrataClone[™] PCR Cloning Vector pSC-A (Stratagene): 3,5 kb; Ampicillin-
Resistenz; multiple cloning site (MCS); lacZ α -Gen

pCR[®] XL-TOPO[®] (Invitrogen): 3,5 kb; Kanamycin- und Zeocin-Resistenz;
multiple cloning site; lacZ α -Gen; ccdB (controlled cell death)
Letal-Gen

pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen): 3,9 kb; Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz;
multiple cloning site, lacZ α -Gen

ZAP Express[™]II Vektor (Stratagene)

4.2 Nährmedien und Agarplatten

Alle Medien wurden nach folgenden Anleitungen hergestellt und im Anschluss bei 121°C und 1,0 bar für 30 Minuten autoklaviert.

LB-Medium (pro Liter)	10 g NaCl 10 g Tryptone 5 g Hefeextrakt pH 7,0
NZY-Medium (pro Liter)	5 g NaCl 2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 5 g Hefeextrakt 10 g NZ-Amine (Caseinhydrolysat)
LB-Agar (pro Liter)	20 g Agar-Agar pro Liter LB-Medium pH 7,5 eingestellt mit 10 mM NaOH
NZY-Agar (pro Liter)	15 g Agar-Agar pro Liter NZY-Medium
NZY-Topagar (pro Liter)	7 g Agarose pro Liter NZY-Medium
SM-Medium (pro Liter)	5,8 g NaCl 2,0 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 50 ml 1 M Tris/CL (pH 7,5) 5 ml 2% (w/v) Gelatine

Nach dem Autoklavieren wurde der LB- bzw. NZY-Agar in Petrischalen gefüllt. Es wurden Petrischalen mit verschiedenen Durchmessern verwendet:

Ø kleine Platten: 85 mm

Ø große Platten: 145 mm

Um ein selektives Wachstum bestimmter Bakterien zu begünstigen, wurde dem Medium, nachdem es autoklaviert und auf 55°C abgekühlt war, die entsprechende Menge der folgenden Antibiotika zugesetzt:

Ampicillin:	100 mg pro Liter LB-Medium
Kanamycin:	50 mg pro Liter LB-Medium
Tetracyclin	50 mg pro Liter LB-Medium

Für die Blau-Weiß-Selektion (siehe 5.11.1) wurde der LB-Agar mit X-Gal/IPTG und Ampicillin versetzt:

1 Liter LB-Medium

100 mg/l Ampicillin

0,5 mM IPTG (Isopropyl- β -D-1-Thiogalactopyranosid)

80 μ g/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galactopyranosid)

Auch hier wurde dem autoklavierten LB-Medium erst nach dem Abkühlen auf 55°C das Antibiotikum hinzugefügt. Die gefüllten Petrischalen wurden bei 4°C im Kühlraum, die Nährmedien bei Raumtemperatur dunkel gelagert.

4.3 Glycerinkulturen

Um Bakterien eines Klons für mehrere Monate aufzubewahren, wurden sie bei -78°C in einer Glycerinkultur gelagert. Dazu wurde 1 ml einer Übernachtskultur der betreffenden Bakterien mit derselben Menge einer 50%igen Glycerinlösung versetzt, gemischt und anschließend eingefroren.

4.4 Plattenkulturen

Die Bakterien einer Glycerinkultur wurden mit einer ausgeglühten Platinöse auf einer Agarplatte, welche ein geeignetes Antibiotikum beinhaltet, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Diese Platte wurde bei 4°C gelagert und konnte mehrere Wochen verwendet werden.

4.5 Flüssigkultur

Um eine Flüssigkultur herzustellen, wurde eine Bakterienkolonie mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze oder eines sterilen Zahnstochers von einer Plattenkultur gepickt und in ein geeignetes Kulturmedium überführt. Anschließend wurde der Ansatz bei 37°C über Nacht bei 200 rpm geschüttelt. Die Zugabe von Antibiotikum hing von dem jeweiligen Verwendungszweck ab und wird in den einzelnen Abschnitten entsprechend aufgeführt.

4.6 MgSO₄-Kultur von Bakterienstämmen

Von einer Plattenkultur wurde eine Bakterienkolonie gepickt und in ein Nährmedium aus 30 ml LB-Medium, 0,2% (w/v) Maltose, 10 mM MgSO₄ und Tetracyclin (50 µg/ml) überführt. Die Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bei 200 rpm kultiviert, bis ein Extinktionswert größer eins (bei 600 nm) erreicht war. Anschließend wurde die Kultur 10 Minuten bei 2400 rpm (~ 1000 x g) und 4°C in der Heraeus-Zentrifuge pelletiert. Das Bakterienpellet wurde mit einem halben Volumen der Ausgangsmenge in 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) in einem Spektrophotometer (Ultraspec® Plus; Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Als Referenz wurde bakterienfreie MgSO₄-Lösung verwendet. Ein OD₆₀₀-Wert von 1 entspricht dabei ~ 8 x 10⁸ *E. coli*-Bakterien. Die Suspensionen wurden bei 4°C gelagert.

4.7 Kompetente Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte nach der CaCl₂-Methode (Cohen et al., 1972). Hierzu wurde eine Kolonie des *E. coli*-Bakterienstammes XL1-blue von einer Masterplatte gepickt und eine Übernachtskultur angesetzt. Durch Zugabe des Antibiotikums Tetracyclin wurde das Wachstum unerwünschter Bakterien verhindert. Die Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bei 200 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein Aliquot der Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 in LB-Medium aufgenommen und bei 37°C geschüttelt, bis sich ein OD₆₀₀-Wert von etwa 0,2 einstellte. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase, in der sie besonders aufnahmefähig gemacht werden können. Anschließend wurden die Bakterien bei 3500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Sorvall® RC-5B; Du Pont Instruments, Bad Homburg). Das Pellet wurde in 20 ml eiskaltem 0,1 M MgCl₂ resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Bakterien in 2 ml 0,1 M CaCl₂ aufgenommen und für mindestens 30 Minuten auf Eis quellen gelassen. Nach dieser Behandlung konnten die Bakterien für die Transformation eingesetzt werden. Die kompetenten Bakterien waren bei 4°C bis zu einer Woche verwendbar.

4.8 Transformation kompetenter Bakterien

Für eine Transformation wurden 50 µl der kompetenten Bakterien mit 10 ng Plasmid-DNA gemischt, 45 Minuten auf Eis inkubiert und danach einem kurzen Hitzeschock (30 Sekunden, 42°C) ausgesetzt. Zum Ansatz wurde 250 µl LB-Medium gegeben. Dieser wurde anschließend bei 37°C inkubiert und nach 60 Minuten auf Agarplatten ausplattiert.

5. Allgemeine molekularbiologische Methoden

5.1 Präparation genomischer DNA

Für die Präparation von genomischer DNA wurde das *DNA Extraction Kit* (Stratagene) verwendet. Das Gewebe wurde homogenisiert, wobei darauf geachtet wurde, Scherkräfte zu vermeiden. Durch Zugabe des Enzyms Pronase wurden die Proteine abgebaut und anschließend zusammen mit den Zelltrümmern gefällt. Nach Degradation der RNA durch Zugabe von RNase wurde die genomische DNA mit 100%igem Ethanol gefällt und als weißer „hairball“ mit einem Glasstab aufgewickelt. Die DNA wurde in TE-Puffer resuspendiert.

TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 7,6
------------------	-----------------------------------

5.2 RNA-Präparation

Bei dem Umgang mit RNA ist im Allgemeinen darauf zu achten, dass eine Verunreinigung durch RNasen vermieden wird. Dazu wurden alle Arbeitsschritte möglichst zügig und mit Handschuhen durchgeführt. Zudem wurden autoklavierte Gefäße und Geräte, RNase-freie Materialien und gestopfte Spitzen verwendet. Es wurde bidestilliertes und mit 0,1% (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltes Wasser benutzt. DEPC inhibiert irreversibel im Wasser enthaltene RNasen durch kovalente Bindung an ihre aktiven Zentren. Durch Autoklavieren reagiert DEPC mit Wasser unter Hydrolyse zu CO₂ und Ethanol und hat somit keine Auswirkungen mehr auf weitere Reaktionen.

5.2.1 Präparation von Gesamt-RNA

5.2.1.1 GITC-Methode

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde die GITC-Methode (Guanidinisothiocyanat) (Chomczynski & Sacchi, 1987) angewendet.

Es wurde frisch präpariertes, oder bei -80°C eingefrorenen Gewebe für die RNA-Präparation eingesetzt. Das Gewebe wurde in 10 - 20 ml GITC-Puffer pro Gramm Gewebe mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Gefrorenes Gewebe wurde vor dem Homogenisieren in GITC-Puffer aufgetaut. Das im GITC-Puffer enthaltene Guanidinisothiocyanat ist ein chaotropes Salz, das in Anwesenheit eines reduzierenden Agens (β -Mercaptoethanol) die hydrophoben Wechselwirkungen in Proteinen destabilisiert und diese somit denaturiert. Zusätzlich spaltet das im Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken in Proteinen. Pro 10 ml GITC-Puffer wurden 1 ml 2 M Natriumacetat, 5 ml Phenol und 5 ml CIA (Chloroform/Isoamylalkohol) zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde die Suspension auf Eis 15 Minuten gekühlt und dann zentrifugiert ($6000 \times g$, 50 min, 4°C). Durch diese Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 5.3) konnten die ausgefällten Proteine, unter anderem auch die im Gewebe vorhandene RNasen, von den Nukleinsäuren abgetrennt werden. Bei dieser Fällung ist es wichtig, den pH-Wert des Ansatzes durch Verwendung von saurem Phenol und Natriumacetat im sauren Bereich (pH 4,0) zu halten. In solch einem Milieu erzielt man einerseits eine bessere Auftrennung von RNA und DNA, andererseits haben RNasen im sauren Bereich eine niedrigere Aktivität. Nach der Zentrifugation befanden sich die Proteine in der unteren organischen Phase. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Falcon überführt und mit 1 Volumen eiskaltem Isopropanol gemischt. Anschließend erfolgte die Präzipitation bei -20°C für mindestens 1 Stunde (siehe 5.4). Im Anschluss wurde erneut zentrifugiert ($6000 \times g$, 50 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml GITC-Puffer gelöst. Darauf folgte eine zweite Fällung der RNA mit einem Volumen Isopropanol. Das abzentrifugierte Pellet ($6000 \times g$, 50 Minuten, 4°C) wurde mit 1 ml eiskaltem 80%igem Ethanol gewaschen und solange an der Luft getrocknet, bis sich der Alkohol verflüchtigt hatte. Anschließend wurde die RNA in etwa 37°C warmen DEPC-Wasser gelöst. Die Lagerung der präparierten Gesamt-RNA erfolgte bei -20°C .

GITC-Puffer	4 M Guanidinthiocyanat 25 mM Na-Citrat, pH 7,0 0,5% (w/v) N-Laurylsarcosinat 100 mM β -Mercaptoethanol (Zugabe nach dem Autoklavieren)
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol (49:1)
2 M Natriumacetat	pH 4,0
Saures Phenol	wassergesättigt

5.2.1.2 RNA-Präparation mittels Säulenaufreinigung

Zur Isolation von RNA über Säulchen wurde das *E.Z.N.A. Invertebrate RNA Kit* (Peqlab, Erlangen) verwendet. Dieses Kit schließt die Entfernung von Mucopolysacchariden mit ein, die bei den meisten Invertebraten in großen Mengen vorliegen. Die zugrunde liegende Methode basiert auf der reversiblen Bindung von RNA an die Silicamembran eines Zentrifugensäulchens.

Das Gewebe wurde laut Protokoll in denaturierendem Puffer mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Das Lysat wurde anschließend auf die Zentrifugensäulen gegeben, an deren Silicamembran die RNA gebunden wurde. Durch anschließende Waschschrte wurden störende Proteine und Kontaminationen entfernt. Mit DEPC-Wasser konnte die RNA aus der Silicamembran eluiert werden. Die gelöste RNA wurden bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

5.2.2 mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA

Um aus einer Gesamt-RNA-Lösung mRNA zu isolieren, wurde das *PolyAtract® System I* (Promega, Mannheim) verwendet. Dieses Präparationssystem basiert darauf, dass die meisten eukaryotischen mRNA-Moleküle im Gegensatz zu anderen RNA-Molekülen an ihrem 3'-Ende einen poly-A⁺-Schwanz haben. An dieser Region der mRNA hybridisieren spezifisch mit Biotin markierte oligo(dT)-Primer. Das Biotin wiederum bindet mit hoher Affinität an Streptavidin, welches mit einem paramagnetischen Partikel (PMP) gekoppelt ist. Diese Komplexe lassen sich in einem magnetischen Feld von den restlichen RNA-Molekülen

trennen und aufreinigen. Durch Erniedrigung der Salzkonzentration löst sich die Bindung zwischen dem oligo(dT)-Primer und der poly-A⁺-RNA. Somit kann die mRNA mit DEPC-Wasser eluiert werden. Die Isolierung wurde laut Herstellerangaben durchgeführt.

5.3 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Mit Hilfe der Phenol/Chloroform-Extraktion können Proteine und einzelne Nukleotide aus einer DNA-Lösung entfernt werden.

Der zu reinigenden Lösung wurde ein Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) zugegeben, durch Vortexen gemischt, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und bei 1000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. In der daraus resultierenden Phasenauftrennung war eine milchige Interphase erkennbar, in der sich die Proteine und proteinassoziierten Nukleinsäuren befanden. Die wässrige Phase enthielt die Nukleinsäuren. Sie wurde in ein frisches Gefäß überführt und mit je einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (CIA, 49:1) zweimal extrahiert.

5.4 Nukleinsäurepräzipitation mit Alkohol

Dieses Verfahren dient der Aufreinigung von Nukleinsäuren, die in wässriger Lösung vorliegen. Nukleinsäuren bilden durch Zugabe monovalenter Kationen und Alkohol nach 15 bis 30 Minuten ein Präzipitat. Dabei neutralisieren die einwertigen Kationen (z.B. 0,2 M Natriumchlorid oder 0,3 M Natriumacetat) die negativ geladenen Phosphatreste der Nukleinsäuren. Durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol oder zwei Volumina Ethanol wird den Nukleinsäuren die Hydrathülle entzogen, woraufhin diese nach einer Inkubation auf Eis ausfallen. Das Pellet kann durch Zentrifugation (12000 x g, 15 Minuten, 4°C) gewonnen werden. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol und der Trocknung des Pellets kann dieses in geeignetem Puffer gelöst werden.

5.5 PCR-Techniken

5.5.1 Verwendete Primer

Die verwendeten Primer wurden von den Firmen Sigma-Genosys (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Die Auswahl und Überprüfung der Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe folgender Computerprogramme (siehe auch F 5.):

- <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
- http://www.bioinformatics.vg/bioinformatics_tools/oligo2002.shtml

Die Primer sollten folgende Eigenschaften erfüllen:

- einen G-C-Gehalt von etwa 40% bis 60%
- eine Länge von 17 bis 30 Basen
- zueinander passende „Annealing“-Temperatur des forward- und reverse-Primers (Differenz $\leq 5^{\circ}\text{C}$)
- keine Selbst-Komplementarität


Die Primer wurden in bidestilliertem H₂O in einer Konzentration von 100 pmol/ μl gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Die in dieser Arbeit verwendeten spezifischen und degenerierten Primer sind im Anhang aufgelistet (F 3.).

5.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte. Durch die Wahl der Oligonukleotid-Primer können die Grenzen des zu amplifizierenden DNA-Bereiches genau festgelegt werden. Der Reaktionsablauf setzt sich aus mehreren aufeinander folgenden Schritten zusammen. Zu Beginn wird die doppelsträngige „Template“-DNA durch Denaturierung bei 94°C bis 98°C einzelsträngig gemacht. Während des Annealing-Schrittes lagern sich die Oligonukleotid-Primer an die komplementären Sequenzen der DNA an. Dabei ist die „Annealing“-Temperatur abhängig von der jeweiligen Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer. Mit ihrem freien 3'-OH-Ende liefern die Primer den Startpunkt für die thermostabile DNA-Polymerase. Im darauf folgenden Elongationsschritt synthetisiert diese bei einer Temperatur von 68°C bis 72°C in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die zur DNA-

Matrize komplementären Stränge. Die Elongationszeit ist variabel und hängt von der Größe des zu amplifizierenden Fragments ab. Dieser Syntheszyklus wird 30- bis 40-mal wiederholt (abhängig von der Konzentration der „Template-DNA“). Da in jedem Zyklus alle vorliegenden DNA-Matrizen komplementiert werden, steigt die Anzahl an Fragmenten des amplifizierten Bereichs exponentiell an. Zum Auffüllen nicht vollständig synthetisierter Fragmente folgt nach dem letzten Zyklus ein finaler Elongationsschritt bei 68 bis 72°C (10 bis 20 Minuten).

Als Enzym wurde entweder die *Taq-Polymerase* (Invitrogen, Karlsruhe) oder der *Expand DNA-Polymerase-Mix* (Roche, Mannheim) eingesetzt. Die DNA-Polymerase des hitzestabilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase) hat ihr Temperaturoptimum bei 68°C bis 72°C. Der *Expand DNA-Polymerase-Mix* (Temperaturoptimum bei 68°C) besteht aus einer Mischung von Taq-Polymerase und Pwo-Polymerase und ist besonders geeignet, um große DNA-Fragmente zu amplifizieren. Die Taq-DNA-Polymerase hängt an das 3'-Ende der entstehenden Fragmente ein Desoxyadenosin an. Dieser 3'-Überhang ist günstig, wenn man TOPO-TA- bzw. -XL-Cloning durchführt (siehe 5.11). Alle PCRs wurden in Thermocyclern der Firmen Biometra® (*TGradient*) und Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) durchgeführt. Der Thermocycler der Firma Biometra® (*TGradient*) machte es möglich, Reaktionen bei unterschiedlichen „annealing“-Temperaturen gleichzeitig auszuführen. Für jede PCR wurde individuell ein geeignetes Programm erstellt. Der Ablauf eines Standard-PCR-Programms sieht wie folgt aus:

Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	55°C	30 sec	
Elongation	72°C	2 min	
Extended Elongation	72°C	20 min	30x
Kühlung	4°C	∞	



Zur Synthese großer Genabschnitte (> 5 kb) wurde das *Expand Long template PCR System* der Firma Boehringer (Mannheim) verwendet. Abhängig von der Länge der zu synthetisierenden Abschnitte werden drei Reaktionspuffer unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet:

10x Puffer 1 für 5-12 kb, 17,5 mM MgCl₂

10x Puffer 2 für 12-15 kb, 22,5 mM MgCl₂

10x Puffer 3 für >15 kb, 22,5 mM MgCl₂ + Zusatzdetergenzien

Im Folgenden ist der Ablauf eines Expand-PCR-Standardprogramms aufgeführt:

Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	10 sec	 10x
Annealing	50, 55, 60°C	30 sec	
Elongation	68°C	2 min	
Denaturierung	94°C	10 sec	 25x
Annealing	50, 55, 60°C	30 sec	
Elongation	68°C	2 min + 20 sec	
Extended Elongation	68°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

5.5.3 Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin

Um DNA-Fragmente als Sonden für das Screening von DNA-Banken, für Southern-Blots oder *in situ*-Hybridisierungen zu verwenden, wurden die entsprechenden Fragmente über PCR (siehe 5.5.2) mit Digoxigenin (Dig) markiert. Der verwendete *PCR-Dig-Labeling-Mix* (Roche, Mannheim) enthält neben den vier Nukleosidtriphosphaten (dTTP, dATP, dCTP und dGTP) das mit Digoxigenin modifizierte Nukleosidtriphosphat Dig-dUTP. Das Verhältnis von DIG-dUTP zu den übrigen Nukleotiden im Gemisch lag bei 1:20. Abweichend von den Herstellerangaben wurde statt 10 µl *PCR-Dig-Labeling-Mix* nur 2 µl für eine Markierungsreaktion verwendet. Nach Aufreinigung der PCR-Ansätze wurde die Intensität

der Reaktion im Vergleich zu einer Standardlösung mit bekannter Dig-Markierung überprüft. Als Vorlage für die Sonden-PCR dienten entweder Plasmid-DNA oder PCR-Produkte.

5.5.4 GenomeWalker

Diese Methode ermöglicht es, unbekannte genomische Sequenzen zu ermitteln, die im 5'-Bereich einer bereits bekannten Sequenz liegen (Siebert et al., 1995).

Es wurde das *GenomeWalkerTM Universal Kit* (Clontech, Saint-Germain-en-Laye) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Bei dieser Methode werden Aliquots genomischer DNA mit jeweils unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut. An die so gewonnenen DNA-Fragmente werden an beide Enden Adaptern ligiert. Darauf folgt eine PCR mit einem genspezifischen (reverse) und einem adapterhomologen (forward) Primer. Die daraus resultierenden PCR-Produkte werden als Template für eine anschließende „nested“-PCR eingesetzt.

5.5.5 RT-PCR

Dient RNA als Ausgangsmaterial für eine Amplifikation, so muss diese erst über das Enzym reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Zu Beginn der RT-PCR wird die RNA bei 70°C denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Ausgangspunkt für die Synthese der einzelsträngigen cDNA bildet ein Primer, der ein freies 3'OH-Ende bereitstellt. Als Primer können Oligo-(dT)-Primer, random hexamer Primer oder genspezifische Primer dienen, von denen ausgehend die reverse Transkriptase die cDNA synthetisiert. Um den Abbau der RNA durch eventuell vorhandene RNasen zu verhindern, wird Ribonuklease Inhibitor zugegeben. Mit der synthetisierten ss-cDNA kann anschließend eine PCR durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene RT-PCR-Systeme verwendet, die im Folgenden beschrieben werden. Die Reaktionen wurden jeweils nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde der Ribonuklease Inhibitor *RNasin[®]* (Promega, Mannheim) verwendet.

5.5.5.1 Qiagen OneStep RT-PCR

Dieses RT-PCR Kit der Firma Qiagen (Hilden) enthält ein Enzymgemisch aus den Reversen Transkriptasen „Omniscript“ und „Sensiscript“ sowie der DNA-Polymerase „HotStarTaq“. Der Vorteil dieses Kits besteht darin, dass die Reagenzien für die RT und für die anschließende PCR von Beginn an zusammenpipettiert werden können. Dadurch laufen die Reaktionen ohne Unterbrechung nacheinander ab. Die „HotStarTaq“ DNA-Polymerase ist während der reversen Transkription inaktiv und wird nach der RT-Reaktion (50°C) durch 15-minütiges Erhitzen bei 95°C für die anschließende PCR aktiviert.

5.5.5.2 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Das RACE-System (Frohmann et al., 1988; Ohara et al., 1989) stellt eine Variation der RT-PCR dar, um die 3'- bzw. 5'-Enden der cDNA zu amplifizieren. RACE steht für „rapid amplification of cDNA ends“. Das verwendete *5'-RACE-Kit* der Firma Gibco Life Technologies (Karlsruhe) ermöglicht im Speziellen die Amplifizierung von Fragmenten aus dem 5'-Bereich einer mRNA. Dabei wird zuerst mittels einer Reversen Transkriptase und eines spezifischen „reverse“-Primers einzelsträngige cDNA synthetisiert. An deren 3'-Ende hängt das Enzym Terminale Transferase ein poly-dC-Schwanz an (Tailing). Mit dem spezifischen „reverse“-Primer und einem oligo-dG-„forward“-Primer, der an den poly-dC-Schwanz bindet, kann über eine anschließende PCR das zwischen den Primern liegende unbekannte Fragment amplifiziert werden. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.5.5.3 GeneRacer

Das *GeneRacerTM Kit* (Invitrogen, Karlsruhe) ermöglicht - ähnlich wie das 5'-RACE System - die Amplifizierung eines unbekanntes 5'-Bereichs einer mRNA. Der Vorteil des *GeneRacerTM Kits* liegt darin, dass nur mRNA mit Cap-Struktur in der PCR-Reaktion amplifiziert werden. Somit ist gewährleistet, dass die amplifizierten Produkte die vollständige Sequenz der 5'UTR beinhalten. Bei dieser Methode wird zu Anfang die 5'-Cap-Struktur der mRNA durch das Enzym Pyrophosphatase entfernt. An das entstehende 5'-Phosphat ligiert eine RNA-Ligase eine einzelsträngige Oligosequenz. Die anschließende reverse Transkription mit einem spezifischen „reverse“-Primer liefert einzelsträngige cDNA, an deren 3'-Ende sich

die revers transkribierte Oligo-Sequenz befindet. An diesen Sequenzabschnitt kann in der nachfolgenden PCR der zum Kit gehörige *GeneRacer5'Primer* binden. Somit kann über PCR das zwischen dem *GeneRacer5'Primer* und dem spezifischen „reverse“-Primer liegende Fragment amplifiziert werden.

5.6 Gelelektrophorese

5.6.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele verwendet, die je nach Größe des zu erwartenden Fragments 0,5% bis 2% Agarose enthielten. Bei dieser Art der Auftrennung macht man sich zu Nutze, dass die DNA negativ geladen ist und im elektrischen Feld zur Anode wandert. Die Wandergeschwindigkeit in den entsprechend prozentigen Gelen ist abhängig von der Fragmentgröße der DNA. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, versetzt man das Agarosegel mit 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml Gelvolumen. Ethidiumbromid ist ein interkalierendes Molekül, welches sich zwischen den Basenpaaren des DNA-Doppelstranges einlagert und im UV-Licht (UV-Transilluminatoren der Wellenlängen 366 nm, 312 nm und 254 nm) violett fluoresziert. Die zu trennenden Proben wurden mit einem Beladungspuffer vermischt und in die Geltaschen gefüllt. Die Gelkammer wurde mit 1× TBE als Elektrophoresepuffer gefüllt und an ein Netzgerät angeschlossen, das eine konstante Spannung erzeugte. Um die Größe der Fragmente abschätzen zu können, wurde zusätzlich zu den Proben ein Marker (siehe Abb. 9) aufgetragen. Der hier verwendete *Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker* enthält λ-Phagen-DNA, die mit dem Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* geschnitten wurde, sodass Fragmente definierter Größe entstehen. Der ebenfalls eingesetzte *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* besteht aus Plasmid-DNA, die mit geeigneten Endonukleasen verdaut wurde. Nach der Auftrennung erfolgte die Dokumentation über die Aufnahme mit einer CCD-Kamera und einem Geldokumentationssystem der Firma Peqlab (Erlangen).

10 × TBE-Puffer	0,9 M Tris/Cl 0,9 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8,3
6 x Loading Dye (Fermentas, St.Leon-Roth)	50% Glycerin 0,4% Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml

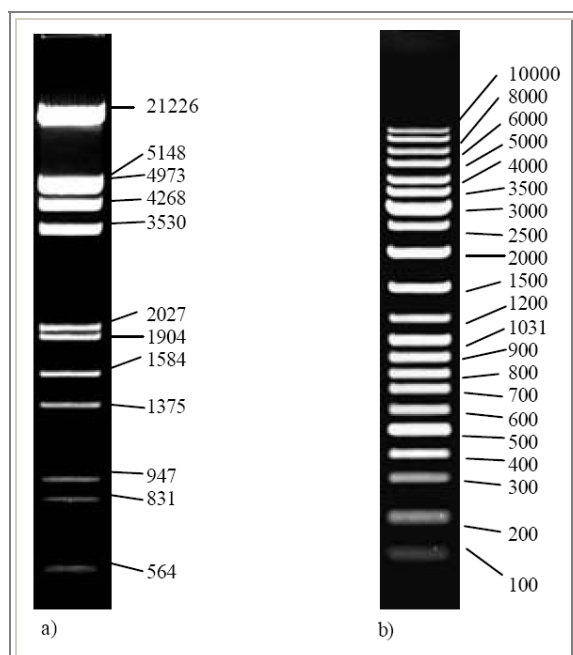


Abb. 9: Verwendete Marker

- a) *Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker* (Fermentas, St.Leon-Roth),
b) *GeneRuler™ DNA Ladder* (Fermentas, St.Leon-Roth).

5.6.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA im Agarosegel

Hierbei gelten prinzipiell dieselben Grundlagen wie für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA (siehe 5.6.1). Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen und eine Degradation der RNA durch RNasen zu verhindern, wurde sowohl dem Probenpuffer als auch dem Gel Formaldehyd zugesetzt. Zudem wurde der Probenansatz für 5 Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eiswasser abgekühlt. Um die RNA sichtbar zu machen, wurde dem Probenpuffer Ethidiumbromid zugesetzt.

10 x MOPS-Puffer	200 mM MOPS (3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäure-Natriumsalz) 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA pH 7, im Dunkeln lagern
10 x Beladungspuffer	50 % Glycerol 0,4 % Bromphenolblau 1 mM EDTA 0,5 µg/ml Ethidiumbromid 25% Formaldehyd
Laufpuffer	1 x MOPS
RNA-Minigel	0,4 g Agarose 4 ml 10 x MOPS-Puffer 29 ml DEPC-Wasser aufkochen und auf ca. 50°C abkühlen 6,8 ml Formaldehyd hinzufügen

5.7 Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Um die DNA aus den Agarosegelen zu extrahieren, wurden folgende Gelextraktionskits gemäß des jeweiligen Protokolls verwendet: *GeneMatrix Agarose-Out DNA Purification Kit Version 5.0* (Roboklon, Berlin), *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) und *NucleoSpin Extract Kit* (Macherey-Nagel, Düren).

Der entsprechende Gelbereich wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und bei 50°C in Puffer liquidiert. Die flüssige Probe wurde auf eine Säule gegeben, die eine DNA-bindende Silicagelmembran besitzt. An dieser wird die DNA unter Hochsalzbedingungen und einem pH-Wert unter 7,5 gebunden. Es folgten mehrere Waschschrte zur Entfernung von Verunreinigungen. Anschließend konnte die DNA mit 50 µl Wasser oder Elutions-Puffer eluiert werden.

5.8 PCR-Aufreinigung

Die PCR-Aufreinigung dient dazu, PCR-Produkte von allen weiteren Komponenten eines PCR-Ansatzes zu reinigen. Hierzu wurde das *E.Z.N.A.[®] cycle pure Kit* (Peqlab, Erlangen) verwendet. Es beruht auf der reversiblen Bindung der DNA unter Hochsalzbedingungen an

einer Silicagelmembran (siehe auch 5.7). Nach mehreren Waschschritten kann die DNA unter Niedrigsalzbedingungen aus der Membran eluiert werden.

5.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde das *E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I* (Peqlab, Erlangen) verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Dieses Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979), anschließender Präzipitation der bakteriellen Proteine und der genomischen DNA sowie der reversiblen Bindung von DNA an die Silicagelmembran eines Zentrifugensäulchens.

Von Übernachtskulturen wurden 1,5 ml entnommen und in ein Eppendorf-Tube überführt. Die Bakterien wurden für 10 Minuten bei 1000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde durch Zugabe dreier Lösungen resuspendiert, lysiert und neutralisiert. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Im Pellet sammelte sich der bakterielle Niederschlag, während die Plasmid-DNA im klaren Überstand blieb. Dieser wurde in ein Zentrifugensäulchen gegeben, an dessen Silicamembran die Plasmid-DNA reversibel gebunden wurde. Mit Wasser oder geeignetem Puffer konnte die Plasmid-DNA eluiert werden.

5.10 Restriktionsverdau

Mit diesem Verfahren kann getestet werden, ob ein Insert erfolgreich in ein Plasmid ligiert wurde. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen des Typs II wird der Vektor innerhalb der „multiple cloning site“ (MCS) auf beiden Seiten der Insertionsstelle in einer für die jeweiligen Restriktionsenzyme spezifischen Sequenzabfolge gespalten. Typ II Restriktionsenzyme erkennen 4 bis 8 bp lange, palindromische Sequenzabfolgen und schneiden die DNA an diesen definierbaren Stellen. Einige Vektoren besitzen beidseitig des Inserts eine Schnittstelle für dasselbe Restriktionsenzym, so dass hier ein Einzelverdau durchgeführt werden kann. Restriktionsenzyme mit nur einer Schnittstelle in der Vektorsequenz müssen in Kombination mit anderen Restriktionsenzymen eingesetzt werden (Doppelverdau). Dabei wurden die Enzyme so ausgewählt, dass sie nach Herstellerangaben gleiche oder ähnliche Pufferkonzentrationen benötigten. Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma Stratagene (Heidelberg) und MBI Fermentas (St.Leon-Roth) bezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren besitzen auf beiden Seiten der Insertionsstelle eine *EcoRI*-Schnittstelle. Daher war

im Standardfall ein Einzelverdau mit *EcoRI* ausreichend. Für den Verdau wurde folgender 10 μ l Reaktionsansatz pipettiert:

Plasmid-DNA [\sim 400ng]	2 μ l
Restriktionsenzym [2-10 U]	x μ l
10 x Puffer	1 μ l
H ₂ O	x μ l

Abb. 10: Pipettierschema eines Restriktionsverdaus mit 10 μ l Gesamtvolumen

Der Restriktionsverdau erfolgte für mindestens 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Das Ergebnis des Verdaus wurde durch anschließende Gelelektrophorese (5.6.1) überprüft.

5.11 Klonierung

Die Klonierung von PCR-Fragmenten bietet die Möglichkeit, DNA-Fragmente in reiner Form zu vervielfältigen. Dabei werden DNA-Fragmente nach vorangegangener PCR-Aufreinigung bzw. gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Gelextraktion in Plasmidvektoren ligiert. Diese werden in Wirtszellen transformiert, was zur Folge hat, dass sich die Plasmidvektoren in den Wirtszellen vervielfältigen.

Zur Ligation wird die Vektor-DNA durch die kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase nach der spezifischen Sequenz 5'-CCCTT gespalten. Die Vektoren liegen demnach linearisiert vor und tragen an beiden Enden ein überhängendes 3'-Desoxythymidin. Da die zu klonierenden PCR-Fragmente beiderseits ein überhängendes Adenosintriphosphat besitzen, sind sie kompatibel zu den Plasmidvektoren. Das 3'-Phosphat des gespaltenen DNA-Stranges geht eine Bindung mit der Hydroxylgruppe eines Tyrosylrestes der Topoisomerase ein. Durch den Angriff des 5'OH des PCR-Produktes wird diese Bindung wieder aufgehoben, sodass letztlich das DNA-Insert in den Vektor hineinligiert wird.

In dieser Arbeit wurden die Vektoren *pCR[®]2.1-TOPO[®]* (Invitrogen), *pCR[®]-XL-TOPO[®]* (Invitrogen), *StrataClone[™]-pSC-A* (Stratagene) und *pGEM-T Easy[™]* (Promega) verwendet (siehe Abb. 11 bis Abb. 14). Die Klonierungen wurden nach Herstelleranleitung durchgeführt. Für die Ligation wurde jedoch nur die Hälfte der angegebenen Menge an Vektor eingesetzt. Als Wirtszellen wurden die jeweiligen, zum Kit gehörigen Bakterien verwendet (*Top 10[®]* (Invitrogen), *StrataClone[™] SoloPack Competent Cells* (Stratagene), *JM109 Competent Cells*, High Efficiency (Promega)).

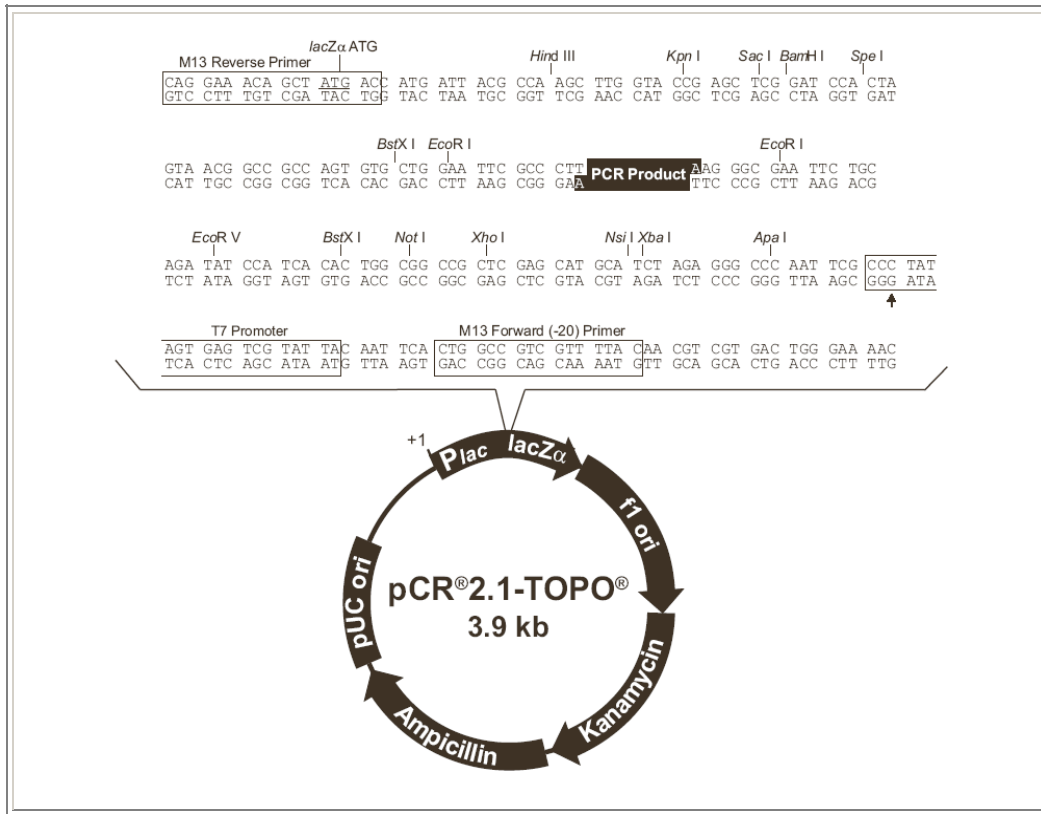


Abb. 11: pCR[®] 2.1-TOPO[®] Klonierungsvektor (nach Invitrogen)

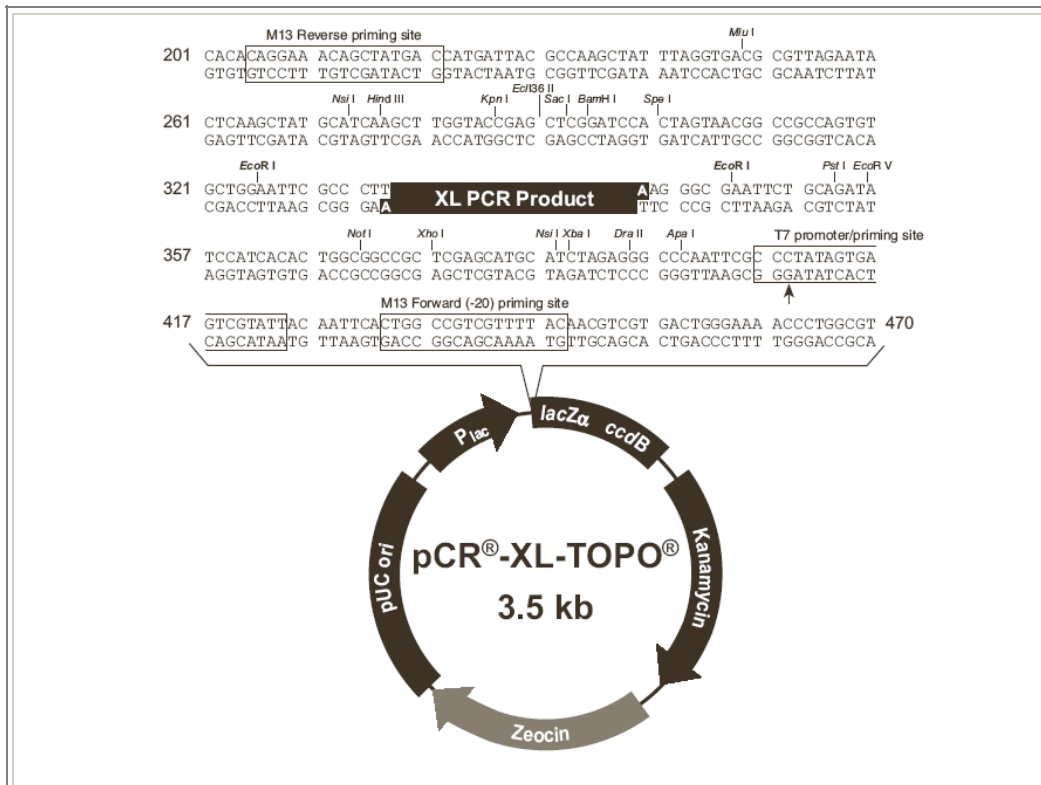


Abb. 12: pCR[®]-XL-TOPO[®] Klonierungsvektor (nach Invitrogen)

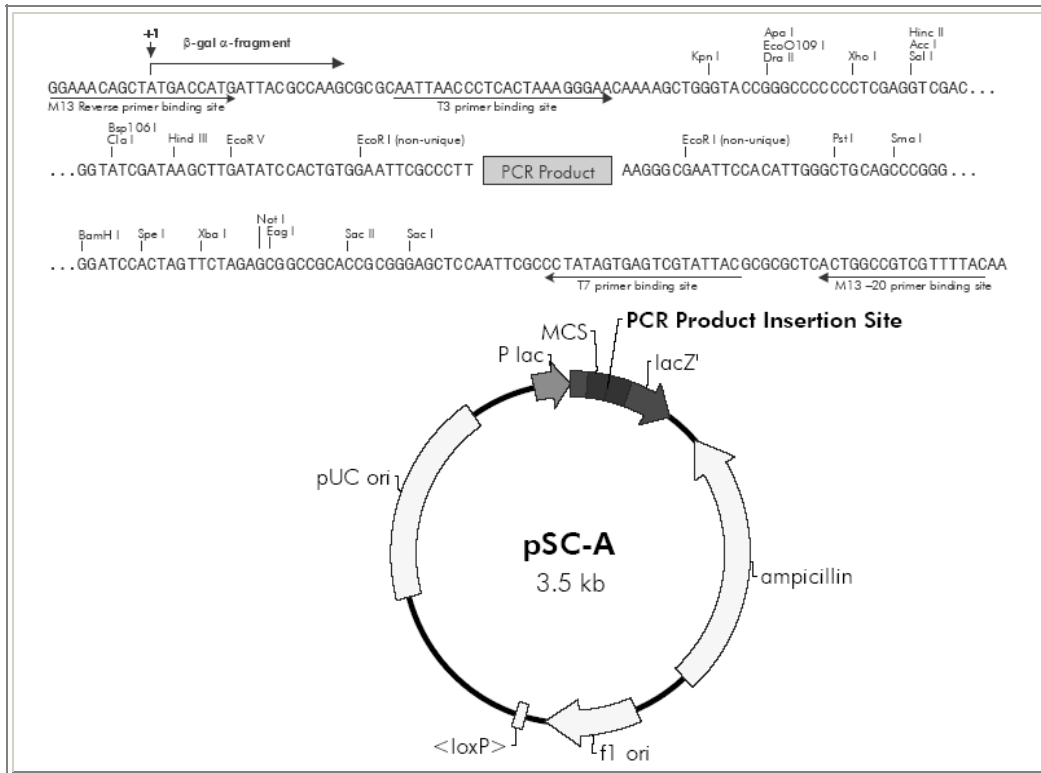


Abb. 13: StrataClone™ PCR Klonierungsvektor pSC-A (nach Stratagene)

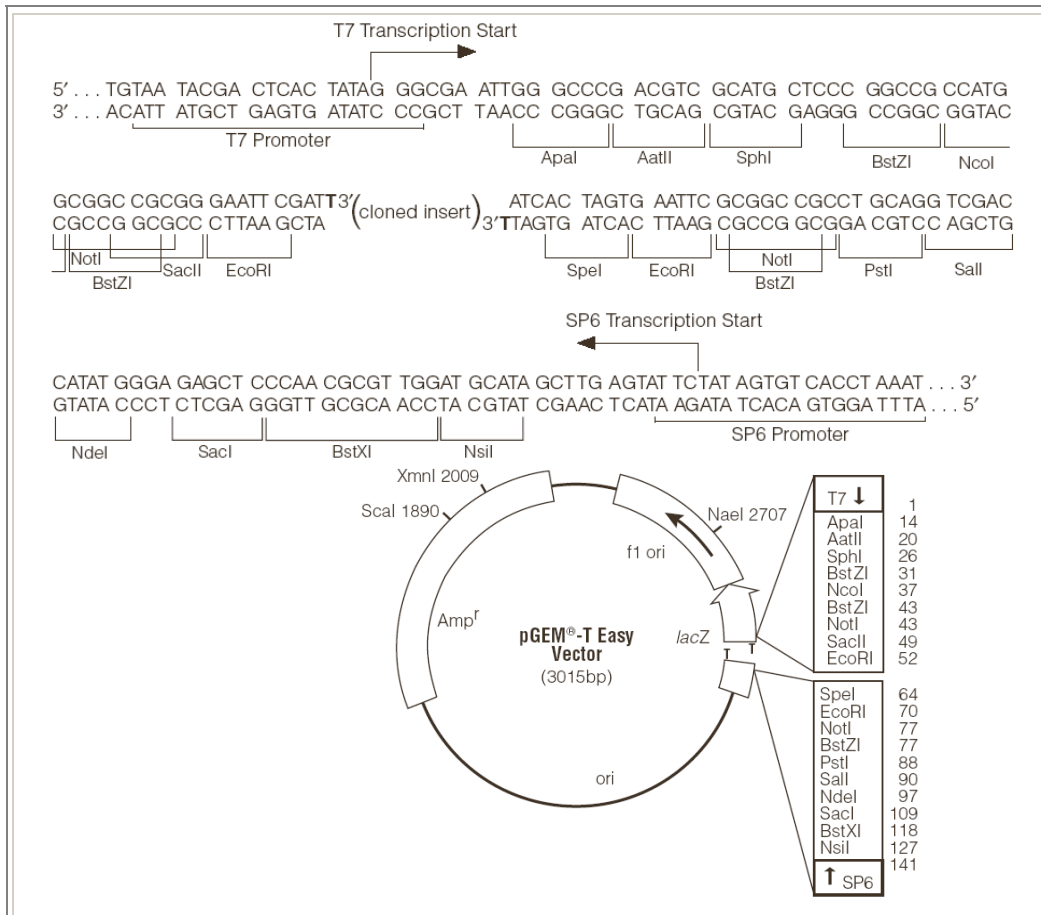


Abb. 14: pGEM-T Easy™ Klonierungsvektor (nach Promega)

5.11.1 Blau-Weiß-Selektion

Über Blau-Weiß-Selektion können Bakterienklone identifiziert werden, in die erfolgreich ein inserttragendes Plasmid transformiert wurden.

Da die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen werden, die Ampicillin enthalten und die verwendeten Plasmide ein Ampicillin-Resistenz-Gen tragen, können nur Bakterienklone wachsen, in die ein Plasmid transformiert wurde. Mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion können dann die Bakterienklone selektiert werden, die ein Plasmid aufgenommen haben, in das ein Insert ligiert wurde. Der verwendete *E.coli*-Stamm trägt ein mutiertes *lacZ*-Gen, das nur für den α -Peptidteil der β -Galactosidase kodiert. Der fehlende Abschnitt, der für die Bildung des Enzyms erforderlich ist, wird vom Plasmid geliefert. Die Expression dieses Plasmidabschnittes bleibt aus, wenn ein Insert innerhalb des kodierenden Bereiches hineinligiert wurde. Somit ist die β -Galactosidase-Aktivität ein Indiz dafür, dass kein Insert in das transformierte Plasmid ligiert wurde. Fehlende β -Galactosidase-Aktivität deutet darauf hin, dass das Plasmid ein Insert trägt. β -Galactosidase weist man durch eine Reaktion nach, bei welcher vom dem Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galactopyranosid) durch die β -Galactosidase eine chromophore Gruppe abgespalten und zu einem blauen Produkt umgesetzt wird.

Die weißen, inserttragenden Klone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze oder einem sterilen Zahnstocher von der Platte gepickt und in LB-Medium mit 100 μ g Ampicillin pro ml LB-Medium überführt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C geschüttelt (200 rpm).

5.11.2 Letal-Gen-Selektion

Der verwendete Vektor *pCR[®]-XL-TOPO[®]* (Invitrogen) besitzt ein *ccdB*-Gen. Dieses kodiert für ein Enzym, das die bakterielle DNA-Gyrase zerstört und somit letal wirkt. Da die Insertionsstellen innerhalb des *ccdB*-Gens liegen, wird es nur exprimiert, wenn kein Insert das Leseraster zerstört. Dadurch können nur Bakterien wachsen, in deren Plasmid ein Insert ligiert wurde.

5.12 Southern Blot

Bei dieser Methode werden DNA-Moleküle, die im Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine geeignete Trägermembran (Nylon oder Nitrocellulose) übertragen und fixiert. Anschließend können die gewünschten DNA-Moleküle durch Einsatz einer spezifischen, markierten Sonde detektiert werden.

Das DNA-Gel wurde vor dem Transfer für 30 Minuten in Denaturierungspuffer inkubiert, um die DNA in die Einzelstränge zu zerlegen und somit eine spätere Hybridisierung mit der Sonde zu ermöglichen. Danach wurde das Gel für 30 Minuten in Neutralisierungspuffer gelegt. Die Blot-Apparatur wurde entsprechend dem in Abb. 15 gezeigten Schema aufgebaut. Als Transferpuffer wurde 20 x SSC verwendet. Das „Blotting“ erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur getrocknet und dann für 30 Minuten bei 80°C im Trockenschrank gebacken, um die DNA auf der Membran zu fixieren. Nach dem Trocknen wurde die Membran zweimal für 5 Minuten in Äquilibriumlösung inkubiert. Durch eine einstündige Prähybridisierung bei 68°C in Hybridisierungspuffer wurden freie Bindungsstellen auf der Membran abgedeckt. Für die anschließende Hybridisierung wurden 300 ng digoxigeninmarkierte DNA (siehe 5.5.3) in 30 ml Hybridisierungspuffer gelöst (10 ng/ml), für 10 Minuten im Wasserbad bei 95°C denaturiert und danach sofort auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C im Schüttelwasserbad. Die Sondenlösung wurde abgenommen und konnte bei -20°C gelagert und mehrfach wieder verwendet werden. Um überschüssige Sonde von der Membran zu entfernen wurden zwei fünfminütige Waschschrte in 2 x SSC/0,1% SDS bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss wurden unspezifisch gebundene Sonden durch stringente Waschschrte entfernt. Dazu wurden die Filter zweimal 15 Minuten bei der ursprünglichen Hybridisierungstemperatur in 0,5 x SSC/0,1% SDS leicht geschüttelt. Dann wurde die Membran in Waschpuffer äquilibriert. Darauf folgte die Blockierung der Membranen mit Blockierungslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Detektion der DNA-Sonde wurde die Membran für 60 Minuten mit einem anti-Digoxigenin-Fab-Fragment (Roche) inkubiert (1:7500 in Blockierungslösung), an welches die alkalische Phosphatase gekoppelt war. Überschüssige anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente wurden durch dreimaliges Waschen in Waschpuffer (je 5 Minuten bei Raumtemperatur) entfernt. Nachdem die Membran in AP-Puffer äquilibriert wurde, konnte die Farbreaktion durch Zugabe der Färbelösung herbeigeführt werden. Dabei wurde BCIP durch die alkalische Phosphatase zu einem violett-braunen Produkt umgesetzt, während NBT als Farbverstärker und Katalysator der Reaktion diente. Etwa 15 Minuten nach Zugabe der Färbelösung setzte die Farbreaktion ein. Bei der

gewünschten Signalintensität wurde die Farbreaktion durch Spülen in Wasser abgestoppt. Die detektierten Banden konnten anhand des Gelfotos zugeordnet werden.

20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl 1 M Tris/Cl pH 7,4
Äquilibrierungslösung (2 x SSC)	0,3 M NaCl 0,03 M NaCitrat pH 7,0
Hybridisierungspuffer	5 x SSC 0,1 % N-Laurylsarcosin 0,02 % SDS 1 % (w/v) Blockingreagenz (zum Lösen auf ~ 50°C erwärmen)
Waschpuffer	0,15 M NaCl 0,1 M Tris/Cl pH 7,5
Blockierungslösung	Waschpuffer 1 % (w/v) Blockingreagenz
AP-Puffer	0,1 M Tris 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl ₂ pH 9,5
Substrat NBT	50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid (NBT = p-Nitrobluetetrazoliumchlorid)
Substrat BCIP	50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid (BCIP = 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz)

Färbelösung

66 μ l NBT
33 μ l BCIP
in 10 ml AP-Puffer

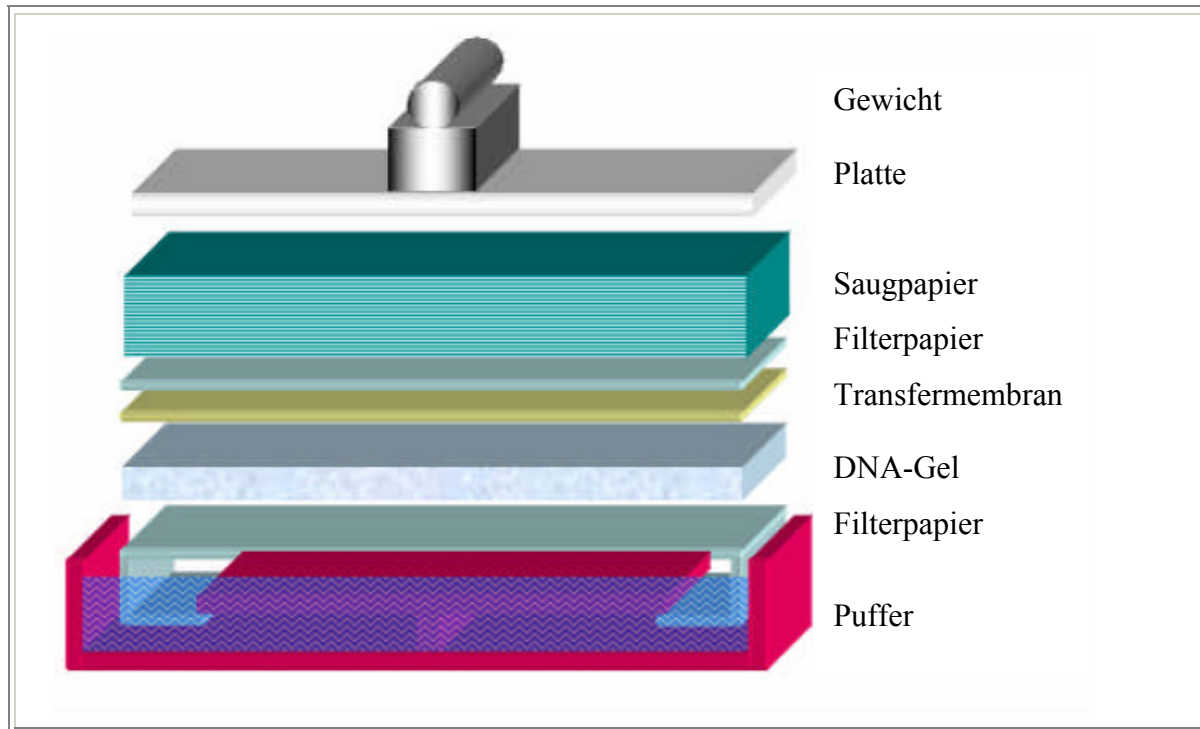


Abb. 15: Southern Blot-Apparatur

Das zu blottende Gel wird mit den Probestaschen nach unten auf ein Filterpapier (*Whatman*[®] 3MM) gelegt, welches zu beiden Seiten in das Pufferreservoir hineinragt. Auf das Gel werden die Transfermembran aus Nylon und drei Schichten Filterpapier deckungsgleich platziert. Diese sollten die Ausmaße des Gels haben. Darauf folgen einige Lagen Saugpapier. Um den Aufbau zu beschweren, wurde eine mit einem Gewicht versehene Platte aufgelegt. Durch den Sog des Transferpuffers (20 x SSC) vom Pufferreservoir bis zum Saugpapier wird die DNA vom Gel auf die Membran transferiert.

5.13 Erstellen einer genomischen DNA-Bank

Für die Herstellung einer genomischen DNA-Bank wurden das *ZAP-Express*[®] *Vector Kit* und das *ZAP Express*[®] *Gigapack*[®] *III Gold Cloning Kit* von Stratagene verwendet. Alle Komponenten wurden erst kurz vor Gebrauch zügig aufgetaut, gemischt, kurz abzentrifugiert und dann auf Eis gelagert. An einigen Stellen wurde vom Protokoll des Herstellers abgewichen, worauf an den jeweiligen Stellen verwiesen wird.

5.13.1 Verdau der genomischen DNA

Die genomische DNA von *Megathura crenulata* wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut. Dafür wurden 10 µg DNA mit 160 Units *EcoRI* und entsprechendem Puffer zusammenpipettiert und bei 37°C für 6 Stunden verdaut. In einer Phenol/Chloroform-Fällung (siehe 5.3) wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und die DNA von den Bestandteilen des Restriktionsansatzes gereinigt. Anschließend wurde photometrisch die DNA-Konzentration gemessen und über Gelelektrophorese der Verdau der DNA überprüft.

5.13.2 Ligation der *EcoRI*-Adapter

Da die DNA mit *EcoRI* verdaut wurde, besaßen sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende der DNA *EcoRI*-Enden. An diese wurden *EcoRI*-Adapter ligiert. Das optimale Verhältnis von DNA zu Vektor betrug 100 ng/1 µg. Es wurde folgender Ligationsansatz pipettiert:

DNA (100 ng)	x µl
10 x Ligase Puffer	0,5 µl
10 mM rATP (pH 7,5)	1 µl
Zap Express Vektor (1 µg/µl)	1 µl
T4 DNA-Ligase (4 U/µl)	0,5 µl
mit H ₂ O auf ein Gesamtvolumen von 4,5 µl auffüllen	

Der Ansatz wurde für 48 Stunden bei 4°C ligiert. Nach 24 Stunden wurden nochmals 0,5 µl 10 mM rATP, 50 ng DNA und 0,5 µl T4 DNA-Ligase dazugegeben.

5.13.3 Verpackung der DNA

Der Verpackungsansatz wurde unmittelbar vor dem Gebrauch aus der -80°C Tiefkühltruhe entnommen und zügig zwischen den Fingern aufgetaut. Zum Ansatz wurde 1 µl der ligierten DNA zugesetzt und die Lösungen vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt. Der Reaktionsansatz wurde kurz abzentrifugiert und bei 22°C für 2 Stunden inkubiert. Durch Zugabe von 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform wurde die Reaktion abgestoppt. Nach einer kurzen Zentrifugation für 30 Sekunden bei 3000 rpm befanden sich die Bakteriophagen im Überstand. Die so erhaltene Primärbank konnte bei 4°C aufbewahrt werden.

5.13.4 Titerbestimmung der Primärbank

Zur Bestimmung des Primärtiters wurden jeweils 600 µl einer frischen MgSO₄-Kultur (siehe 4.6) von XL1-Blue MRF⁺Bakterien (OD₆₀₀ ~ 0,5) mit 1 µl der Primärbank bzw. mit 1 µl unterschiedlicher Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, in SM-Medium) versetzt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Zu diesen Ansätzen wurden anschließend etwa 8 ml geschmolzener und auf 48°C temperierter NZY-Top-Agar gegeben, kurz gemischt und zügig auf vorgewärmte große NZY-Platten gegossen. Nach dem Abkühlen und Erstarren des Top-Agars wurden die Platten umgedreht und bei 37°C über Nacht inkubiert, bis sich ein geschlossener Bakterienrasen gebildet hatte. Bakterien, die mit einem Phagen infiziert wurden, hinterließen Löcher im Rasen, so genannte Plaques. Bei ausreichender Verdünnung konnte die Anzahl der Plaques und damit der „*plaque forming units*“ (pfu) bestimmt werden.

5.13.5 Amplifikation der Primärbank

Die Primärbank wurde vollständig auf NZY-Agarplatten mit ~ 5 x 10⁴ pfu pro Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden mit 8 ml SM-Medium überschichtet und bei 4°C über Nacht sanft geschüttelt. Die im SM-Medium eluierten Phagen wurden abgenommen, bevor die Platten ein weiteres Mal mit 2 ml SM-Medium gespült wurden. Die beiden Phagenlösungen wurden vereint. Nach Zugabe von Chloroform [Endkonzentration 5% (v/v)] wurde die Lösung gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 500 x g wurden Zelltrümmer entfernt. Der klare Überstand wurde abgenommen und mit Chloroform (Endkonzentration 0,3% (v/v)) versetzt. Die auf diese Weise amplifizierte Bank konnte bei 4°C aufbewahrt werden. Zur dauerhaften Konservierung der Bank wurden Aliquots mit 7% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid) gemischt und bei -80°C gelagert. Der Titer der DNA-Bank wurden durch eine Verdünnungsreihe der Phagen bestimmt (siehe 5.13.4).

5.14 Screening einer genomischen Bank

Die genomische DNA-Bank von *Megathura crenulata* wurde mit spezifischen DNA-Sonden nach den erwünschten Hämocyanin-Sequenzen durchsucht. Es wurde die Methode der „Plauefilterhybridisierung“ angewandt, wobei das Plauemuster im Bakterienrasen auf eine Membran übertragen wurde. Die verwendeten Dig-markierten Sonden (siehe 5.5.3) wurden mit Hilfe von Primern amplifiziert, die aus bereits bekannten Hämocyanin-Sequenzen gewählt wurden.

Für die erste *Screening*-Runde wurden auf großen Agarplatten jeweils 5×10^4 „*plaque forming units*“ (pfu) ausplattiert. Dazu wurden 600 μ l XL1-Blue MRF' Bakterien ($OD_{600} \sim 0,5$) mit der entsprechenden Menge an Phagensuspension versetzt. Die Ansätze wurden für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und danach mit 8 ml 48°C warmen NZY-Top-Agar auf vorgewärmte, große NZY-Platten ausplattiert. Nachdem der Top-Agar abgekühlt und erstarrt war, wurden die Platten umgedreht bei 37°C über Nacht in den Brutschrank gestellt. Bevor die Filter aufgelegt werden konnten, mussten die Platten für mindestens eine Stunde kühl gelagert werden, um ein Ablösen des Top-Agars beim Abziehen der Filter zu vermeiden. Die beschrifteten Nylonfilter wurden zur Orientierung an drei verschiedenen Punkten mit einer ausgeglühten, heißen Nadel durchstochen und nach 2 bis 3 Minuten vorsichtig abgezogen. Diese wurden dann mit der Unterseite nach oben für 10 Minuten auf ein mit Denaturierungslösung durchtränktes *Whatman*[®] 3MM Papier gelegt. Anschließend wurden die Filter auf dieselbe Weise für 15 Minuten neutralisiert und 10 Minuten lang äquilibriert. Die Nylonfilter wurden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 30 Minuten bei 80°C im Trockenschrank gebacken, wodurch die Phagen-DNA fest an die Membran gebunden wurde. Die Nylonfilter wurden anschließend für eine Stunde bei 68°C in Hybridisierungslösung prähybridisiert. Für die darauf folgende Hybridisierung wurde die Sonde in Hybridisierungslösung aufgenommen (~ 10 ng/ml) und für 10 Minuten im Wasserbad bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C im Schüttelwasserbad. Am nächsten Tag wurde die Sondenlösung abgenommen und konnte bei -20°C gelagert und mehrfach wieder verwendet werden. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zuerst zweimal 5 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSC/0,1 % SDS und anschließend 30 Minuten in 0,5 x SSC/0,1 % SDS bei 68°C gewaschen. Diese Schritte dienten zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden. Die Nylonfilter wurden kurz in Waschpuffer äquilibriert. Danach wurden die noch freien Bindungsstellen mit Blockierungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend wurden die Filter eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung mit anti-Digoxigenin-

FAB-Fragmenten (1:7500) inkubiert. Diese liegen als Konjugat gekoppelt mit dem Enzym alkalische Phosphatase vor und reagieren spezifisch mit dem Digoxigenin der Sonde. Nicht gebundene Antikörper wurden in drei fünfminütigen Waschschrinen mit Waschpuffer entfernt. Die Filter wurden in AP-Puffer äquilibriert. Zur Detektion der positiven Klone wurden die Filter in Färbelösung inkubiert. Die Farbreaktion erfolgte mit Hilfe des Enzyms alkalische Phosphatase durch Umsetzung des Substrates BCIP zu einem unlöslichen, blauen Farbstoff unter Anwesenheit des Katalysators und Farbverstärkers NBT. Die Farbreaktion wurde durch Spülen in Wasser abgestoppt, sobald eine deutliche Blaufärbung erkennbar war. Die auf diese Weise als positiv identifizierten Phagenklone wurden mittels abgeschnittener Pipettenspitze aus dem Agar ausgestochen und in 400 µl SM-Medium mit 20 µl Chloroform bei 4°C unter Schütteln eluiert. In weiteren *Screening*-Runden wurden diese positiven Phagenklone so lange vereinzelt, bis Einzelplaques gestochen werden konnten.

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl 1 M Tris/Cl pH 7,4
Äquilibrierungslösung (2 x SSC)	0,3 M NaCl 0,03 M NaCitrat pH 7,0
Hybridisierungspuffer	5 x SSC 0,1% N-Laurylsarcosin 0,02% SDS 1% (w/v) Blockingreagenz (zum Lösen auf ~ 50 °C erwärmen)
Waschpuffer	0,15 M NaCl 0,1 M Tris/Cl pH 7,5
Blockierungslösung	Waschpuffer 1% (w/v) Blockingreagenz

AP-Puffer	0,1 M Tris 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl ₂ pH 9,5
Substrat NBT	50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid (NBT = p-Nitrobluetetrazoliumchlorid)
Substrat BCIP	50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid (BCIP = 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyolphosphat-p-Toluidinsalz)
Färbelösung	66 µl NBT 33 µl BCIP in 10 ml AP-Puffer

5.15 *In vivo*-Excision

Der zur Herstellung der genomischen DNA-Bank eingesetzte λ -Vektor enthält neben den λ -Armen des Phagen noch die Sequenz eines Phagemids (pBK-CMV), in welche das Insert eingeschlossen ist. Durch die *in vivo*-Excision kann das Phagemid (samt dem Insert) aus dem λ -Vektor extrahiert werden. Für die *in vivo*-Excision wurden Bakterien mit den λ -Phagen und einem *Ex Assist*TM *Helfer Phagen* (f1 Bakteriophage; Stratagene) koinfiziert. Um den Start- und Endpunkt dieser Excision zu markieren, wurde der „origin of replication“ (ori) des Helfer-Phagen in seine Initiations- und Terminationsstelle getrennt, indem die Sequenz des Phagemids dazwischen eingepasst wurde. Innerhalb des Bakteriums erkennen f1-Bakteriophagen-Proteine die Initiationsstelle, verursachen dort einen Bruch („Nick“) der DNA und beginnen die Synthese von einzelsträngiger (ss)DNA „downstream“ bis zur Terminationsstelle. Das Genprodukt II des Helfer-Phagen zirkularisiert diese lineare Einzelstrang-DNA, wodurch wieder ein f1 „ori“ entsteht. Durch das in der Terminationsstelle enthaltene Verpackungssignal wird die zirkularisierte DNA in Phagenhüllen verpackt und sezerniert. Um doppelsträngige DNA zu erhalten, wurden *E. coli* XL0LR-Zellen mit den verpackten und sezernierten Phagen infiziert. Die Bakteriophagen-Suspension wurde dann auf Kanamycin-LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Helfer-Phagen können nicht wachsen, da sie nicht in der Lage sind, sich in Su⁻-Stämmen wie *E. coli* XL0LR zu replizieren.

Die *in vivo*-Excision erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden die im *Screening* als positiv detektierten Phagenklone amplifiziert, die Titer bestimmt und 1×10^5 pfu für die *in vivo*-Excision eingesetzt.

5.16 *In situ*-Hybridisierung

Die Methode der *in situ*-Hybridisierung wird angewendet, um Nukleinsäuren (RNA oder DNA) in Geweben, einzelnen Zellen oder auf Chromosomen nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen (FISH) und Whole mount *in situ*-Hybridisierungen (WMISH) durchgeführt.

5.16.1 Whole mount *in situ*-Hybridisierung

Zur Detektion der für Hämocyanin kodierenden mRNA in *Haliotis asinina* wurden Whole mount *in situ*-Hybridisierungen angewendet. Mittels PCR wurden Dig-markierte DNA-Sonden hergestellt (siehe 5.5.3), die spezifisch mit der für Hämocyanin kodierenden mRNA hybridisieren. Über eine enzymatische Farbreaktion konnten die Sonden und somit auch die zu lokalisierenden mRNAs detektiert werden. Die Reaktionen liefen bei Raumtemperatur ab, wenn es nicht gesondert beschrieben wurde.

Die Embryonen, Larven und entschalteten Juvenilen wurden zweimal in Methanol gewaschen. Anschließend wurde das Methanol in vier Waschschritten durch PPE ersetzt. Darauf folgte eine Inkubation in PPT für 20 Minuten. Zum Rehydrieren der Proben wurden diese fünfmal in eiskaltem PBT gewaschen. Durch die Behandlung mit Proteinase K (20 µg/ml PBT) bei 37°C für 20 Minuten wurde die Permeabilität des Probengewebes erhöht und dadurch für die Sonden und Antikörper zugänglich gemacht. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion wurden zwei Waschschrritte mit eiskaltem PBT durchgeführt. Darauf folgte ein Waschschrtritt in PBS mit 4% Paraformaldehyd für 45 Minuten und fünf Waschschrritte je 5 Minuten mit PBT. Danach wurden die Proben in einem Hybridisierungsmix bei 48°C für 5 Stunden inkubiert, um unspezifische Bindungsreaktionen zu vermeiden. Die Hybridisierung wurde bei 42°C über Nacht im Hybridisierungsmix durchgeführt, zu dem die Dig-markierte cDNA-Sonde (40 µg/ml) gegeben wurde. Am nächsten Tag wurden die Proben mehrmals bei 50°C gewaschen: dreimal für je 10 Minuten mit 4 x Waschpuffer, zweimal mit 2 x Waschpuffer und zweimal mit 1 x Waschpuffer, jeweils für 15 Minuten. Es folgten drei Waschschrritte in 1 x SSC/0,1% Tween20 für je 20 Minuten, zwei in Maleinsäurepuffer und einer in Blockierungslösung, jeweils für 10 Minuten. Die Proben wurden anschließend für 3 Stunden

in Blockierungslösung inkubiert. Zu der Blockierungslösung wurde der Antikörper (Anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase) in einer Konzentration von 1:2000 (0,5 µl/ml Blockierungslösung) gegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C in dieser Antikörperlösung inkubiert. Danach wurden die Proben sechsmal mit Maleinsäurepuffer und zweimal mit AP-Puffer/0,05 M MgCl₂ gewaschen. Die Farbreaktion wurde mit der Färbelösung bei 4°C unter Lichtausschluss durchgeführt. Nach etwa einer Stunde und Überprüfung der Färbung wurde die Reaktion durch zwei Waschschriffe mit Maleinsäurepuffer und drei weiteren Waschungen mit PBT abgestoppt. Die Proben wurden über Nacht in PBS mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Es folgten vier Waschungen mit PBT und vier Waschschriffe in 40°C warmen H₂O. Die Proben wurden schrittweise durch 100%iges Ethanol dehydriert und zweimal in 100%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit einem Gemisch aus Benzylbenzoat und Benzylalkohol (Verhältnis 2:1 v/v) aufgeklärt und mikroskopisch analysiert.

1 x PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBT	1 x PBS 0,1% Tween20
PPE	1 x PBS 4% Paraformaldehyd 0,05 M EGTA
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 0,1% Tween20 pH 7,5
4 x Waschpuffer	4 x SSC 50% Formamid 0,1% Tween20
2 x Waschpuffer	2 x SSC 50% Formamid 0,1% Tween20

1 x Waschpuffer	1 x SSC 50% Formamid 0,1% Tween20
Proteinase K	20 µg pro ml PBT
Hybridisierungsmix	50% Formamid 5 x SSC 5 mM EDTA 1 x Denhardt's Lösung 100 µg/ml Heparin 100 µg/ml tRNA 0,1% Tween20
Blockierungslösung	2% Blockingreagenz in Maleinsäurepuffer
AP-Puffer	100 mM Tris/Cl pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
Substrat NBT	50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid (NBT = p-Nitrobluetetrazoliumchlorid)
Substrat BCIP	50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid (BCIP = 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz)
Färbelösung	5 µl NBT 3,75 µl BCIP pro ml AP-Puffer / 0,05 M MgCl ₂ / 7,5% Polyvinylalkohol

5.16.2 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)

Zur Untersuchung der chromosomalen Lokalisation der Hämocyanin-Gene bei *Megathura crenulata* wurden Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen (FISH) durchgeführt. Das Prinzip der FISH beruht auf der Hybridisierung markierter einzelsträngiger DNA-Sonden an komplementären Sequenzen der Chromosomen. Die FISH wurde mit DIG-markierten DNA-Sonden (siehe 5.5.3) durchgeführt, die spezifisch an den Hämocyanin-Genen der jeweiligen

Isoform hybridisieren sollten. Beide Sonden umfassten einen etwa 2400 bp langen, intronübergreifenden Sequenzbereich von der FU-h bis in die 3'UTR (Abb. 27).

Die Chromosomenpräparate wurden einer Vorbehandlung unterzogen, um noch vorhandene RNA zu entfernen, die einen unspezifischen Signalhintergrund hätte hervorrufen können. Dazu wurden die Präparate in 2 x SSC für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen, anschließend mit 100 µl RNase A-Lösung (0,2 mg pro ml 2 x SSC) überschichtet und mit einem Deckglas versehen in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Präparate wurden für 5 Minuten in 1 x PBS gewaschen und anschließend in einer ansteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und 100% Ethanol) je 5 Minuten dehydriert und anschließend luftgetrocknet. Die Präparate wurden in Prähybridisierungslösung 4 Minuten bei 72°C denaturiert. Um einer vorzeitigen Renaturierung der chromosomalen DNA vorzubeugen, wurden die Präparate in einer eiskalten, ansteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und 100% Ethanol) je 5 Minuten gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA-Sonden wurden zum Hybridisierungsmix gegeben (6 ng Sonde pro µl Hybridisierungsmix), 5 Minuten bei 82°C denaturiert und im Anschluss für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. 20 µl des Hybridisierungsgemisches wurden auf die Objektträger aufgetragen, mit einem Deckglas (24 x 32 mm) blasenfrei abgedeckt und mit Flüssigkleber („Fixogum“, Marabuwerke, Tamm) versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte für 12 bis 16 Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Objektträger zweimal für 5 Minuten in 50% Formamid/2 x SSC und zweimal für 5 Minuten in 2 x SSC bei 37°C gewaschen, um überschüssige und unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Anschließend wurden die Präparate für 5 Minuten bei Raumtemperatur in 4 x SSC/0,1% Tween20 äquilibriert.

Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte mit dem *Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection* (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben. Bei diesem System wird durch eine Antikörperkaskade die Sensitivität der DIG Erkennung erhöht, wodurch die Fluoreszenz-Signale verstärkt werden. Die Präparate wurden mit einer Propidiumjodid/Antifade-Lösung (5 µg/ml) gegengefärbt und mit einem Leica Mikroskop (Leica I3 Filterset, BP 450-490, LP 515) ausgewertet.

20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,2
1 x PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBT	1 x PBS 0,1% Tween20
RNase A-Lösung	0,2 mg RNase A pro ml 2 x SSC
Hybridisierungsmix	50% Formamid 10% Dextransulfat 2 x SSC
Prähybridisierungslösung	70% Formamid 2 x SSC

6. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen kann anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Eine Extinktions-Einheit A_{260} entspricht hierbei:

ds DNA 50 µg/ml

ss DNA 37 µg/ml

ss RNA 40 µg/ml

Zusätzlich kann anhand der Extinktionswerte bei 260 und 280 nm der Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung bestimmt werden. Bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren, sodass sich daraus die Konzentration an Protein ermitteln lässt. Die Nukleinsäurelösung hat eine ausreichende Reinheit, wenn der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegt. Ein erhöhter Wert bei 230 nm spricht für eine Verunreinigung der Probe mit Polysacchariden.

Die optische Dichte (OD) von Bakteriensuspensionen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

7. Sequenzanalyse

7.1 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden nach dem „Taq Dye Terminator Cycle Sequencing“-Prinzip durchgeführt, welches auf der Kettenabbruchsynthese von Sanger (1977) basiert.

In dem für die Sequenzierungs-PCR verwendeten *Big Dye® 3.1 Premix* (Applied Biosystems, Darmstadt) sind neben dNTPs auch die für jede Base charakteristisch fluoreszenzmarkierten 2'-3'-ddNTPs (Dideoxy-Nucleotidtriphosphate) enthalten. Die ddNTPs verhindern eine Fortführung der Strangsynthese, da sie am 3'-C-Atom keine OH-Gruppe tragen. Dadurch entstehen in der PCR verschieden lange Kettenabbruch-Produkte, je nachdem, wann ein ddNTP anstelle eines dNTPs von der DNA-Polymerase zufällig in den wachsenden Strang eingebaut wird. Die fluoreszenzmarkierten Sequenzierungsprodukte werden ihrer Länge nach im denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Detektor passieren sie einen Laser, der die Fluoreszenzfarbstoffe anregt. Der Detektor erfasst nacheinander die Emissionen der markierten Basen, und erstellt daraus das Sequenz-Chromatogramm. Die Aufreinigung sowie die Detektion der Proben wurden von der Firma GENTERprise (Mainz) durchgeführt.

7.2 Sequenzauswertung am Computer

Die Bearbeitung und Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe verschiedener Computerprogramme, deren Internetadressen im Anhang (F 5.) aufgeführt sind. Die Sequenz-Chromatogramme wurden mit dem Programm „Chromas“ visualisiert und editiert. Die Übersetzung der Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem „Expasy-Tool Translate“. Mit dem Internet-Programm „Blast“ konnte in Datenbanken nach ähnlichen DNA- („BlastN“) und Proteinsequenzen („BlastP“) gesucht werden. „BlastX“ ermöglichte eine Übersetzung in alle sechs Leseraster und einen anschließenden Vergleich mit Proteindatenbanken. Mit „ClustalX“ wurden Sequenzvergleiche („Alignments“) von multiplen DNA- und Aminosäuresequenzen berechnet. Manuelle „Alignments“ wurden mit „GeneDoc 2.6“ erstellt (Nicholas & Nicholas, 1997). Phylogenetische Berechnungen und Analysen wurden mit „PHYLIP 3.6a2 Package“ (Felsenstein, 2001) und mit MRBAYES 3.0 durchgeführt (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Die erhaltenen Stammbäume wurden mit „Treeview“ ausgewertet.

8. Allgemeine proteinbiochemische Methoden

8.1 Aufbereitung der Hämolymphe

Die verwendete Hämolymphe von *Haliotis asinina* wurde im Labor von Bernard Degnan (Brisbane, Australien) aus einem adulten Tier entnommen, auf Eis geliefert und dann umgehend aufgereinigt. Die gesamte Hämocyanin-Probe wurde für 15 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert, um Gewebereste und größere Verunreinigungen zu entfernen. Vom Überstand wurden je 175 µl Hämolymphe auf vier Zentrifugenröhrchen (Ultra-Clear Centrifuge Tubes, 8 x 20 mm von Beckmann) verteilt und in einer BeckmanTM Airfuge Zentrifuge für 2 Stunden bei 40 psi (> 132000 x g) pelletiert. Die restliche Hämolymphe wurde mit Proteasehemmer (Endkonzentration 1 mM) versetzt und bei 4°C gelagert. Das Hämocyanin-Pellet wurde in Stabilisierungspuffer aufgenommen, der mit Proteasehemmer versetzt war (Endkonzentration 1 mM), und über Nacht auf dem Schüttler im Kühlraum gelöst.

Stabilisierungspuffer 50 mM Tris
 5 mM CaCl₂
 5 mM MgCl₂
 0,15 M NaCl
 pH 7,4

Proteasehemmer-Stammlösung 100 mM, gelöst in H₂O

8.2 Konzentrationsbestimmung und Absorptionsspektrum des Hämocyanins

Zur Konzentrationsbestimmung des Hämocyanins wurde ein Absorptionsspektrum von 250 nm bis 700 nm in dem Ultraspec 3100 Pro UV/Visible Spectrophotometer gemessen. Dabei traten zwei für das Hämocyanin charakteristische Absorptionsmaxima bei 280 nm und 340 nm auf. Das erste Maximum ist typisch für Proteine, da bei dieser Wellenlänge die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin absorbieren. Dabei entspricht eine OD₂₈₀ von 1 einem Proteingehalt von 1 mg/ml. Bei 340 nm besitzt oxygeniertes Hämocyanin (Cu-O₂-Cu-Komplex) ein Absorptionsmaximum. Somit kann durch die Messung bei dieser Wellenlänge Hämocyanin in der Probe nachgewiesen werden.

8.3 Dissoziation des Mollusken-Hämocyanins in seine Untereinheiten

Die Dissoziation des Hämocyanins in seine Untereinheiten erfolgte durch Dialyse (Keller et al., 1999) mit einem alkalischen Medium unter Entzug zweiwertiger Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Die Probe wurde in einen etwa 20 cm langen Dialyseschlauch (Visking Typ 2032 von Roth, Karlsruhe) gegeben, der zuvor in H_2O für 10 Minuten aufgekocht wurde. Der Schlauch wurde mit 1 ml der Hämocyanin-Probe (1 mg/ml) befüllt, in ein mit Glycin-Puffer gefülltes Becherglas gegeben und über Nacht bei 4°C unter ständigem Rühren dialysiert.

1% Glycin -Puffer 10 g Glycin pro Liter H_2O (0,13 M)
pH 9,6 (mit NaOH eingestellt)

8.4 Eindimensionale elektrophoretische Auftrennung

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen mit Hilfe eines Spannungsfeldes. Die Elektrophorese erfolgte sowohl unter denaturierenden (SDS-PAGE) als auch unter nicht-denaturierenden Bedingungen (native PAGE). Die Polyacrylamidgele bestanden aus einem grobmaschigen Sammelgel und einem höher vernetzten Trenngel. Acrylamid bildet in Anwesenheit von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethyldiamin (TEMED) lange Ketten, die von $\text{N,N}'$ -Methylenbisacrylamid zu einer netzförmige Struktur verknüpft werden. Die Porengröße der Matrix ist abhängig von der Konzentration an Acrylamid und $\text{N,N}'$ -Methylenbisacrylamid.

8.4.1 SDS-PAGE

Dieses Verfahren (nach Laemmli, 1970) dient der Bestimmung des Molekulargewichts von monomeren Proteinen oder von den Untereinheiten eines oligomeren Proteins, wobei die elektrophoretische Auftrennung hierbei nur von der Molekülgröße abhängt. Anstelle von β -Mercaptoethanol wurde Dithiothreitol (DTT) als reduzierendes Agens verwendet. Durch die Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die Eigenladung des Proteins überdeckt, da SDS an die Proteine bindet und diese dadurch mit einem negativen Mantel umgibt. Die Proteine wandern demnach zur Anode. Um das Molekulargewicht der Proteine anhand der Laufstrecke bestimmen zu können, wird ein Marker mit Eichproteinen aufgetragen („SDS-6H“; Sigma, Deisenhofen).

Der Proteinmarker enthielt folgende Substanzen:

Mr 29000	Carboanhydrase
Mr 45000	Ovalbumin
Mr 66000	Rinderserumalbumin
Mr 97400	Phosphorylase b
Mr 116000	β -Galactosidase
Mr 205000	Myosin

Es wurden 3 bis 9 μ l *H. asinina* Hämocyanin aufgetragen. Als Referenzproben dienten zum einen *H. tuberculata* Hämocyanin, zum anderen *Nautilus pompilius* Hämocyanin, die in gleichen Konzentrationen mit aufgetragen wurden. Die Proben wurden mit 25% Laemmli-Probenpuffer versetzt und zusammen mit dem Marker bei 95°C auf dem Heizblock für 5 Minuten denaturiert. Die Ansätze wurden kurz abzentrifugiert und in die Geltaschen pipettiert.

4 x Probenpuffer

62,5 mM Tris/HCl
 25 mM Dithiothreitol (DTT, frisch hinzugeben)
 10% (w/v) Glycerin
 3% SDS
 0,1% Bromphenolblau

8.4.2 Native PAGE

Die Elektrophorese wurde nach dem nicht-denaturierenden Borat-System (Markl et al., 1979) durchgeführt. Hierbei werden die Proteine in nahezu nativer Konformation und somit in Abhängigkeit ihrer Molekülmasse, spezifischer Eigenladung und ihrer Tertiärstruktur elektrophoretisch aufgetrennt. Die zu analysierenden Hämocyanin-Proben wurden in verschiedenen Konzentrationen (2 bis 10 μ g) aufgetragen. Als Marker-Proteine wurden 10 μ g einer bekannten HtH-Probe eingesetzt, die beide Hämocyanin-Isoformen beinhaltet. Die Proben wurden mit 25% Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen.

4 x-Probenpuffer

20 % Saccharose
 0,5 % Bromphenolblau

8.4.3 Gelherstellung

Es wurden vertikale Elektrophoresekammern (PHERO minivert; Biotec Fischer, Reiskirchen) im Format 80 x 82 mm verwendet. Das Gel bestand aus einem großmaschigen Sammelgel sowie einem engmaschigeren Trenngel. Das Sammelgel, das zur besseren Fokussierung der Proteinbanden über das Trenngel gegossen wurde, hatte eine Acrylamid-Konzentration von 3,9 %, das Trenngel war 5%ig.

Zur Herstellung der Gele wurden zwei Glasplatten aufeinander gelegt (davon eine „Ohrenplatte“ mit einer 2,8 cm tiefen Einbuchtung), die durch zwei 1 mm dicke Abstandshalter (Spacer) getrennt wurden. Diese wurden an drei Seiten mit Klammern zusammengehalten und mit 1%iger, aufgekochter Agarose an den Außenkanten abgedichtet. Danach wurde das 5%ige Trenngel angesetzt, bis etwa 1,5 cm unter den Rand der Ohrenplatte gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation (ca. 30 Minuten) wurde das Ethanol entfernt und die Geloberfläche mehrmals mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde die kurz zuvor angesetzte Sammelgelmischung bis unter den Rand der Ohrenplatte blasenfrei auf das Trenngel gegossen. In die noch flüssige Gellösung wurde ein Probenkamm (1 cm Dicke; 12 Taschen) luftblasenfrei eingesetzt. Nach etwa 30 Minuten war das Gel polymerisiert und konnte entweder sofort verwendet, oder aber mit feuchten Tüchern umwickelt in einer Frischhaltebox bei 4°C bis zu zwei Wochen aufbewahrt werden.

Für die Elektrophorese wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und der obere wie der untere Puffertank mit Laufpuffer aufgefüllt. Der Probenkamm wurde entfernt und das Gel mit den Proben und dem Marker beladen. Der obere Puffertank wurde mit der Kathode und der untere Tank mit der Anode verbunden. Die Elektrophorese lief bei einer konstanten Stromstärke von 15 - 25 mA pro Gel, bis die Lauffront des im Beladungspuffer enthaltenen Farbstoffes (Bromphenolblau) den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten vorsichtig von dem Gel abgehoben. Das Sammelgel wurde von dem Trenngel entfernt und verworfen. Das Gel wurde für eine Stunde in einer Coomassie-Lösung auf einem horizontalen Kippschüttler geschwenkt. Anschließend wurde das Gel so lange in Entfärberlösung entfärbt bis nur noch die Probenbanden angefärbt waren. Zur Lagerung wurden die Gele mit 7,5% Essigsäure überschichtet.

APS	10% (w/w) in destilliertem H ₂ O (Ammoniumpersulfat)
Acrylamidlösung	Rotiphorese Gel30 37,5:1 (30% (w/v) Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid)
TEMED	99% p.A. (N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin)

Vom System abhängige Lösungen:	SDS-PAGE	native PAGE
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl 0,4% SDS pH 8,8	60 mM Borsäure 1,32 M Tris pH 9,6
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl 0,4% SDS pH 6,8	1 M Tris/HCl pH 7,6
Elektrophoresepuffer	23 mM Tris 190 mM Glycin 0,2% SDS	264 mM Tris 12 mM Borsäure

Gelzusammensetzung:

	5% Trenngel	7,5% Trenngel	10% Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	1,7 ml	2,5 ml	3,3 ml	0,4 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	0,8 ml
H₂O	5,8 ml	5 ml	4,2 ml	2 ml
Temed	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

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

Entfärbelösung 20% Isopropanol
7,5% Essigsäure

8.5 Zweidimensionale Immunelektrophorese

Mit Hilfe der Immunelektrophorese, die nach Weeke (1973) und Kroll (1973) durchgeführt wurde, lassen sich wasserlösliche Proteine immunologisch charakterisieren. In der ersten Dimension lassen sich die Proteine aufgrund ihrer verschiedenen Ladungen elektrophoretisch auftrennen. Dabei haben Größe und Tertiärstruktur der Proteine keinerlei Einfluss auf die Auftrennung, da im niedrig konzentrierten Agarosegel (1%) ein sehr grobmaschiges Gitternetz vorliegt. In der zweiten Dimension wandern die so aufgetrennten Proteine senkrecht zur ersten Trennebene durch ein antikörperhaltiges Agarosegel. Proteine, bei denen es sich um ein Antigen handelt, gehen Antigen-Antikörperkomplexe ein. Wenn der Konzentrationsäquivalenzpunkt zwischen Protein und Antikörper erreicht ist, bilden die Moleküle ein dreidimensionales Netzwerk und sind nach der Färbung als charakteristisches gipfelförmiges Präzipitat sichtbar. Anhand der Form der Gipfel lässt sich eine Aussage über die Verwandtschaft der Proteine treffen.

Für die Auftrennung in der ersten Dimension wurden 10 ml geschmolzene Agarose auf eine Glasplatte (7 x 10 cm) gegossen. Nach dem Abkühlen und Erstarren wurden Löcher (2 bis 4 mm Ø) in die Agarose gestanzt, in die die zu untersuchende Proteinprobe (1 bis 4 µg) aufgetragen wurde. Die Lauffront wurde durch separates Mitlaufen von 2 µl eines gefärbten Markers (0,5% Bromphenolblau; 20% Saccharose in H₂O) sichtbar gemacht. Die Elektrophorese wurde bei 600 V in einer wassergekühlten Multiphor-Apparatur (Modell 2117; Amersham Pharmacia, Freiburg) bei 17°C durchgeführt. Als Pufferbrücke diente Chromatographiepapier (Schleicher & Schuell, Dassel). Die erste Dimension wurde abgestoppt, sobald der Farbstoff das Gelende erreicht hatte. Die Bahn der aufgetrennten Proteinprobe wurde ausgeschnitten und auf die hydrophile Seite eines *Gel Bond*[®]-Films (4,2 x 5 cm; Fa. Biozym, Hess. Oldendorf) übertragen. 2 ml geschmolzene, auf 58°C abgekühlte Agarose wurden mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gemischt, die gegen aufgereinigtes *H. tuberculata*-Hämocyanin 1 (HtH1) und *H. tuberculata*-Hämocyanin 2 (HtH2) gerichtet sind, und auf die freie Stelle des *Gel Bond*[®]-Films gegossen. Die Elektrophorese wurde bei 300 V über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden überschüssige Antikörper entfernt, indem die Gel-Filme für 5 Minuten unter Filterpapier gepresst wurden, das mit 0,6% NaCl-Lösung befeuchtet war. Dann wurden sie für 10 Minuten in 0,6% NaCl-Lösung quellen gelassen. Diese Reinigungsprozedur wurde wiederholt. Danach wurden die Filme mit Filterpapier gepresst, das mit destilliertem Wasser getränkt war. Im Anschluss wurden sie nochmals in destilliertem Wasser quellen gelassen. Die Filme wurden mit einem Fön getrocknet und zum Anfärben der Präzipitate für etwa 4 Minuten in

Färbelösung gegeben. Danach wurden die Filme so lange in Entfärberlösung geschwenkt, bis sich der Hintergrund entfärbt hatte und die Gipfel deutlich erkennbar waren. Abschließend wurden die Filme mit dem Fön getrocknet.

5 x Immunoелеktrodenpuffer	19 mM Na-Diethylbarbiturat 0,1 M Diethylbarbitursäure pH 8,6
1% Agarosegel	1% (w/v) Agarose M (Amersham Pharmacia, Freiburg) in 1 x Elektrodenpuffer lösen und aufkochen
Waschlösung	0,6% NaCl
Färbelösung	Methanol/Eisessig/Wasser (4:1:5 v/v/v) 0,2% Coomassie Brilliant Blue G 250
Entfärberlösung	Isopropanol/Eisessig/Wasser (4:1:5 v/v/v)

9. EM-Aufnahmen

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurden mit einem Kohlenstoff-Film beschichtete Kupfernetzchen (300 bis 400 Maschen) verwendet. Diese wurden in einer Aufdampfanlage einer Hitzeentladung ausgesetzt, um die Kohlenstoffoberfläche hydrophil und somit aufnahmefähiger für die Proteine zu machen. Zum Aufnehmen der EM-Fotografien wurde die „single-droplet-Methode“ im Negative-Staining-Verfahren angewendet (Harris & Horne, 1991). Hierbei wurde das Netzchen mit der Kohlenstoffoberfläche nacheinander durch einen Tropfen Proteinlösung (0,05 - 0,5 mg/ml), drei Tropfen destilliertes Wasser und einen Tropfen Kontrastierungsmittel (2% Uranylacetat, 1 mM Octylglucopyranosid) gezogen. Anschließend wurde das Netzchen auf Filterpapier getrocknet. Für die mikroskopischen Untersuchungen und Aufnahmen der Präparate wurden ein Zeiss EM 900 Transmissions-Elektronenmikroskop und Kodak EM-Filme (Typ 4489) benutzt.

10. Chromosomenpräparation

Die Chromosomen wurden nach der „air-drying-Methode“ (Vitturi, 1992) aus Hodengewebe von *Megathura crenulata* präpariert. Die männlichen Tiere wurden für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer Seewasser-Colchicin-Lösung (0,1%) inkubiert, bevor die Hoden entnommen wurden. Danach wurde das Hodengewebe dreimal für 6 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für mindestens 30 Minuten mit Carnoy-Lösung (Ethanol/Essigsäure-Lösung, Verhältnis 3:1) fixiert. Das Gewebe wurde in 50%iger Essigsäure mit einer spitzen Nadel zerkleinert, um eine homogene Zellsuspension herzustellen. Diese wurde auf einen gereinigten, angewärmten Objektträger aufgetropft. Es wurden Färbungen mit Giemsa (Vitturi et al., 2000), Chromomycin A₃ (CMA₃) und DAPI (Schmid et al., 1983) durchgeführt.

C ERGEBNISSE

1. Sequenz- und Expressionsanalysen

Für die Vetigastroden *Megathura crenulata* und *Haliotis tuberculata* wurde sowohl biochemisch als auch auf Ebene der cDNA nachgewiesen, dass zwei unterscheidbare Isoformen existieren, welche zudem in unterschiedlichen Mengen in der Hämolymphe vorkommen (Markl et al., 1991; Gebauer et al., 1994; Keller et al., 1999). Durch Sequenz- und Expressionsanalysen sollte geklärt werden, wodurch diese differentielle Expression zustande kommt.

1.1 Analysen zur Expression der Hämocyanine von *Haliotis asinina*

Die Grundlage für diese Expressionsanalysen bildeten im Vorfeld durchgeführte Untersuchungen an Hämocyaninen verschiedener Mollusken (u.a. *Haliotis tuberculata*, *Megathura crenulata*, *Nautilus pompilius* und *Nucula nucleus*). Das Hämocyanin der Gastropoden-Art *Haliotis tuberculata* (HtH) wurde besonders eingehend analysiert (Keller et al., 1999; Lieb et al., 1999, 2001; Markl et al., 2001; Altenhein et al., 2002). Neben Sequenzanalysen wurden hierzu unter anderem auch biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. HtH kommt, wie auch KLH, in zwei immunologisch unterscheidbaren Isoformen vor, wobei *in vivo* die Isoform 1 (HtH1) vor allem Didekamere bildet und die Isoform 2 (HtH2) zudem in der Lage ist, Multidekamere zu formen (Keller et al., 1999; Lieb et al., 1999). Die von mir durchgeführten quantitativen mRNA-Analysen an *H. tuberculata* ergaben, dass die mRNAs für die beiden Isoformen in unterschiedlichen Mengen vorliegen (Abb. 16). Im Vorfeld dieser Versuche wurde sichergestellt, dass die RT-PCRs unter definierten Bedingungen für beide Isoformen gleich gut ablaufen. Die Ergebnisse belegen, dass die mRNA der Isoform 2 stärker repräsentiert ist. Diese RT-PCR-Analysen stehen im Widerspruch zu den Erkenntnissen biochemischer Untersuchungen, wonach das Verhältnis von HtH1 zu HtH2 in der Hämolymphe meist bei 3:1 liegt (Markl et al., 1991; Gebauer et al., 1994; Keller et al., 1999).

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen zur Expressionsanalyse wurden an verschiedenen Larvenstadien von *Haliotis asinina* durchgeführt, da von *H. tuberculata* keine Larven zur Verfügung standen.

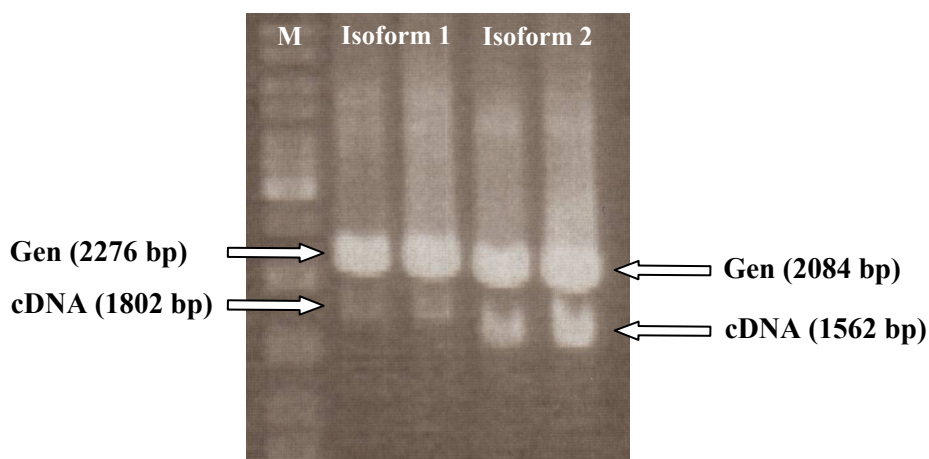


Abb. 16: Quantitative Analyse isoformspezifischer Hämocyanin-mRNA von *Haliotis tuberculata*

Der Nachweis der isoformspezifischen mRNA wurde bei zwei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. In Spur 2 und 3 sind die RT-PCR-Ansätze der Isoform 1 und in Spur 4 und 5 die Ansätze der Isoform 2 aufgetragen. Die oberen Banden repräsentieren die genomischen Fragmente, die in gleichen Mengen amplifiziert wurden. Ein Vergleich der unteren cDNA Banden zeigt, dass deutlich mehr cDNA der Isoform 2 vorliegt. Bei der Präparation der verwendeten RNA wurde kein DNase-Verdau durchgeführt. Spur M: Marker (Fermentas, 100bp Leiter).

1.1.1 Biochemische Untersuchungen

Da an *Haliotis asinina* weder biochemische noch molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt wurden, sollte untersucht werden, ob sich HaH ähnlich verhält wie HtH.

Es wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, um Aufschluss über die Quartärstruktur von *H. asinina*-Hämocyanin (HaH) zu erhalten (Abb. 17). Die hierzu verwendete Hämolymphe wurde von Prof. Bernard Degnan (Queensland University, Australien) zur Verfügung gestellt und über Ultrazentrifugation aufgereinigt. Die Aufnahmen zeigen, dass das HaH wie auch HtH, hauptsächlich Didekamere bildet, vereinzelt aber auch Multidekamere formt.

Um die Größe des Hämocyanins von *H. asinina* einschätzen zu können, wurde HaH zusammen mit aufgereinigtem HtH und *Nautilus pompilius*-Hämocyanin (NpH), deren Molekülmassen bekannt sind, auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die SDS-Page (Abb. 18 A) zeigt, dass HaH mit 400 kDa die gleiche Molekülmasse besitzt wie HtH und somit wahrscheinlich auch aus acht FUs besteht. Bei der Auftrennung der HaH-Proben im nativen Gel (Abb. 18 B) sind eindeutig zwei Banden zu erkennen, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Hämolymphe von *H. asinina*, genau wie die Hämolymphe von *H. tuberculata* (Markl et al., 1991; Gebauer et al., 1994), zwei verschiedene Isoformen beinhaltet.

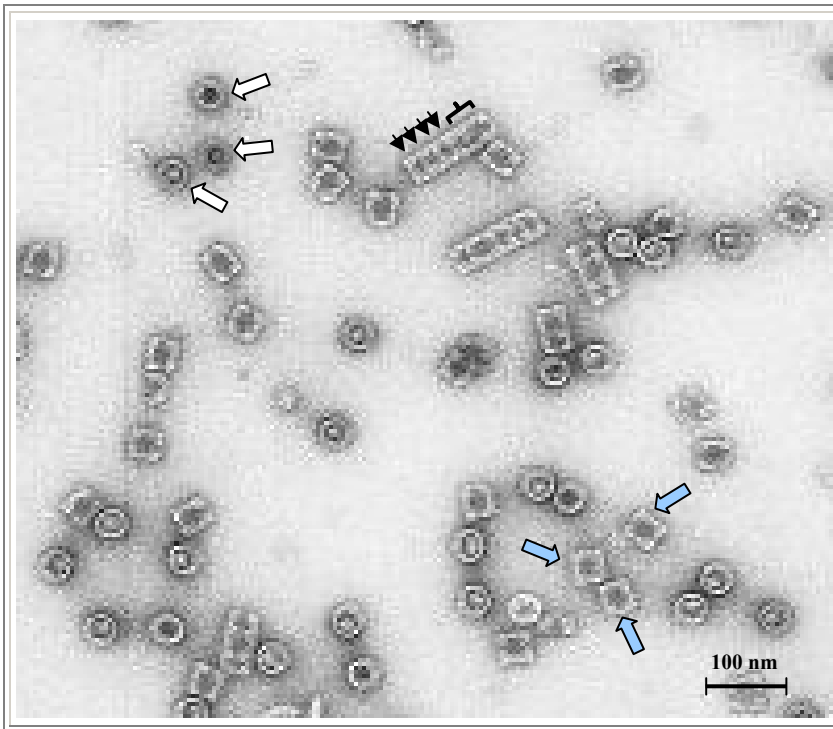


Abb. 17: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativkontrastiertem *Haliotis asinina* Hämocyanin (HaH)

Diese Aufnahme zeigt hauptsächlich Didekamere in der Seitenansicht (blaue Pfeile) und in der Topansicht (weiße Pfeile). Zusätzlich findet man auch Multidekamere, die aus einem Didekamer bestehen (schwarze Klammer), an welches einzelne Dekamere angelagert sind (schwarze Pfeile). Zur Negativkontrastierung wurde 2 % Uranylacetat verwendet.

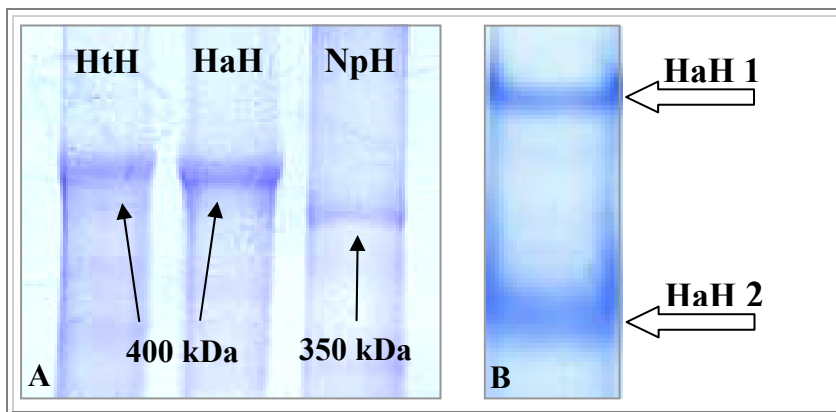


Abb. 18: HaH im SDS-Gel und in nativer PAGE

A) Die 5%ige SDS-PAGE zeigt das Laufverhalten von *Haliotis asinina*-Hämocyanin (HaH) im Vergleich zu den Hämocyaninen von *Haliotis tuberculata* (HtH) und *Nautilus pompilius* (NpH). Von den Proben wurden 5 µg eingesetzt. HaH und HtH laufen auf einer Höhe und deutlich über der 350 kDa Bande des aus 7 FUs bestehenden NpH. Da von HtH bereits bekannt ist, dass es aus acht Domänen besteht und eine Molekülmasse von 400 kDa besitzt, kann für HaH das Gleiche angenommen werden. B) Die 5%ige native PAGE von HaH zeigt zwei Banden. Dies weist darauf hin, dass die Hämolymphe von *Haliotis asinina* mindestens zwei Isoformen besitzt. Es wurden 6 µg der Hämocyanin-Proben aufgetragen und mit Coomassie gefärbt.

Um zu prüfen, ob die beiden Isoformen auch immunologisch differenzierbar sind, wurde das Hämocyanin von *H. asinina* als Antigen in der Crossed-Immunelektrophorese eingesetzt. Als Antiserum wurde ein Gemisch aus bereits vorhandenen, aus Kaninchen stammenden anti-HtH1- und anti-HtH2-Antikörpern verwendet. In der Immunelektrophorese sind zwei deutlich unterscheidbare Gipfel zu erkennen (Abb. 19). Um diese eindeutig den entsprechenden Untereinheiten zuordnen zu können, wurden zusätzlich parallel laufende Crossed-Immunelektrophoresen mit jeweils nur einem der beiden isoformspezifischen Antikörper durchgeführt (nicht gezeigt).

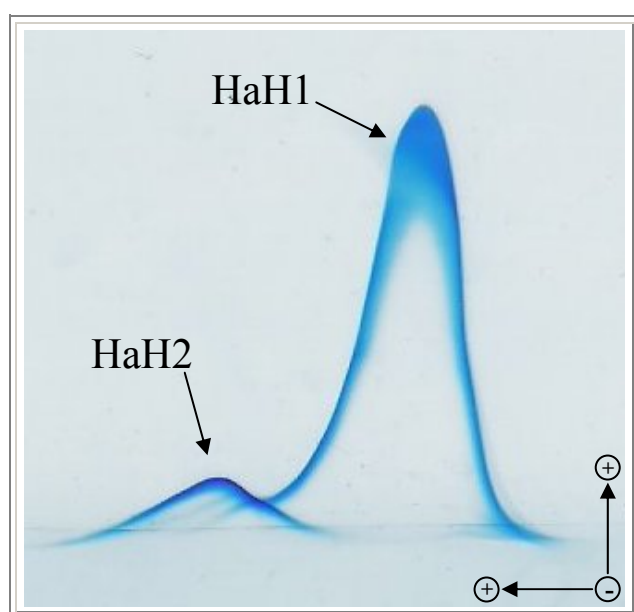


Abb. 19 : Crossed-Immunelektrophorese von aufgereinigtem HaH

Die zwei Peaks repräsentieren jeweils eine Isoform. Als Antikörper wurde ein Gemisch aus Kaninchen-Antikörpern verwendet, die gegen die beiden Isoformen des *Haliotis tuberculata*-Hämocyanins gerichtet sind. Als Antigen wurden 12 µg aufgereinigtes HaH aufgetragen.

1.1.2 Sequenzanalysen des *Haliotis asinina*-Hämocyanins

Anhand der bereits analysierten *H. tuberculata* Sequenzen konnten Primer designed werden, die zum Amplifizieren spezifischer HaH1 und HaH2 cDNAs verwendet wurden. Diese cDNAs repräsentieren Teilsequenzen der FU-f und -g (Tab. 1). Die für die RT-PCR verwendete RNA wurde aus adulten Tieren präpariert.

PCR-Produkt / Klon	US-Primer	DS-Primer	Größe (bp)
HaH1-f/g	HaH-1f 176 US	HaH-1g DS	354
HaH2-f/g	HaH-2f 186 US	HaH-2g 166 DS	352

Tab. 1: cDNA-Fragmente des HaH

Die *H. asinina* Teilsequenzen weisen eine Identität von 91% und 94% zu HtH1 bzw. HtH2 auf (Tab. 2). Somit lassen sich die orthologen Isoformen der beiden *Haliotis*-Arten eindeutig einander zuordnen. Mittels multiplem Sequenzalignment und Rekonstruktion eines Stammbaums wurde zusätzlich die Zuordnung der entsprechenden Teilsequenzen bestätigt (Abb. 20).

	HaH-2f/g	HtH-2f/g	HaH-1f/g	HtH-1f/g
HaH-2f/g		94%	62%	63%
HtH-2f/g	94%		59%	59%
HaH-1f/g	62%	59%		91%
HtH-1f/g	63%	59%	91%	

Tab. 2: Prozentuale Identitäten der f/g-Teilsequenzen beider Hämocyanin-Isoformen von *Haliotis tuberculata* und *Haliotis asinina*

Um in folgenden RT-PCR-Experimenten genomische Kontaminationen identifizieren bzw. ausschließen zu können, wurden zusätzlich die entsprechenden, intronübergreifenden Genabschnitte amplifiziert und analysiert. Das Intron f/g von HaH1 umfasst 276 bp und das von HaH2 800 bp. Aufgrund dieser Intronbereiche lassen sich cDNA- und Genfragmente des HaH eindeutig im Gel unterscheiden.

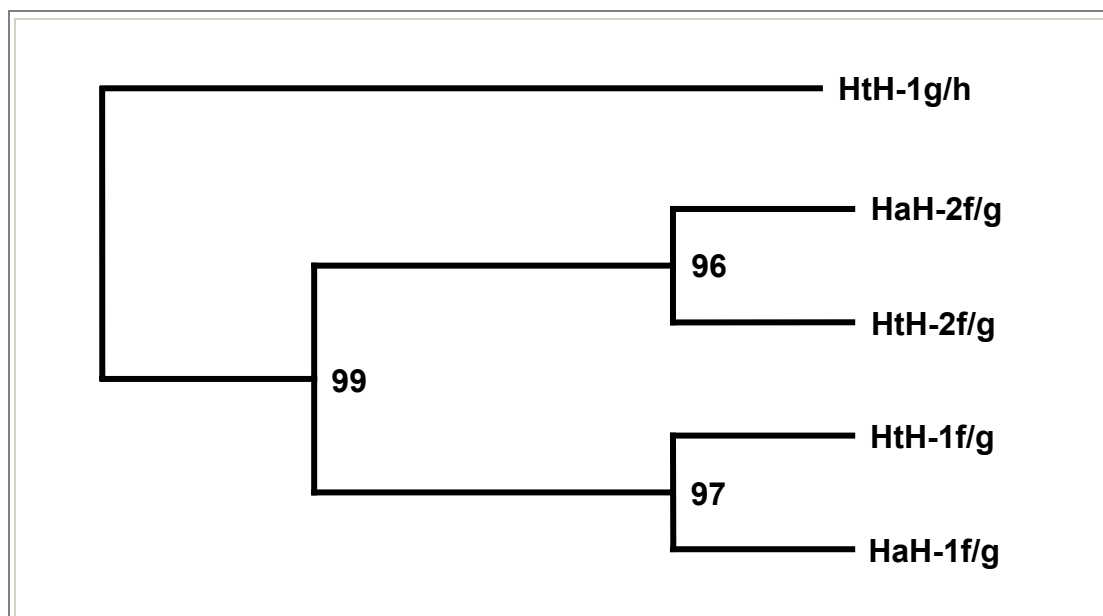


Abb. 20: Phylogenetische Beziehungen der *Haliotis*-Hämocyanin-Gene

Dieser Stammbaum (Neighbor-Joining-, „bootstrap consensus tree“) zeigt, dass sich die beiden Isoformen eindeutig unterscheiden lassen und demnach die orthologen Sequenzen der beiden Arten zusammengruppiert werden. Die Teilsequenz g/h von HtH1 wurde als Außengruppe gewählt.

PCR- und Southern Blot-Analysen mit den cDNAs verschiedener Larvenstadien (3 bis 18, 24, 72 und 114 Stunden), die von der Arbeitsgruppe Degnan zur Verfügung gestellt wurden, ergaben, dass keine maternale Hämocyanin mRNA vorliegt und dass die Expression der beiden Isoformen etwa 9 Stunden nach Befruchtung eintritt. Ab diesem Zeitpunkt sind die HaH1- und HaH2-Transkripte in allen Stadien der Larvalentwicklung nachweisbar. Zusätzlich wurde aus Larven verschiedener Stadien (10, 15, 24, 48, 72 und 130 Stunden) und aus einem adulten Tier RNA präpariert und anschließend quantitative RT-PCRs durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen das Vorhandensein von Hämocyanin-RNA in allen untersuchten Stadien. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNAs der beiden Isoformen in den jeweiligen Stadien etwa gleich stark vertreten sind. Lediglich im 72-Stundenstadium liegt das Verhältnis deutlich auf Seiten der HaH1-mRNA. Diese mRNA-Verteilung spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Whole mount *in situ*-Hybridisierung (WMISH) wider (siehe Abb. 21). Im adulten Tier wurde deutlich mehr mRNA der Isoform 1 nachgewiesen. Dieses mRNA-Verhältnis zwischen Isoform 1 und 2 korreliert nicht mit den ermittelten Konzentrationen der beiden Isoformen in der Hämolymphe adulter Tiere, die mehr HaH2 beinhaltet.

1.1.3 Whole mount *in situ*-Hybridisierung

Mittels Whole mount *in situ*-Hybridisierung (WMISH) wurde an Larven verschiedener Entwicklungsstadien und an juvenilen Tieren der Art *H. asinina* untersucht, ob die Hämocyanin-Gene der beiden Isoformen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien bzw. Geweben differentiell exprimiert werden. Für die WMISH wurden aus Plasmiden (siehe Tab. 1) Digoxigenin-markierte cDNA-Sonden hergestellt, die einer Teilsequenz der FU-f/g entsprechen. Mittels Southern-Blot wurde sichergestellt, dass die so gewonnenen Sonden isoformspezifisch binden. Um Kreuzhybridisierungen mit genomischer DNA auszuschließen, wurden intronüberspannende Sonden verwendet.

Korrelierend zu den RT-PCR-Analysen kann auch mittels WMISH erst ab dem 9-Stundenstadium (Praeveliger) HaH1-mRNA nachgewiesen werden, wohingegen die früheste HaH2-Expression im 15-Stundenstadium (Veliger) auftritt (Abb. 21 A-D). Beide Isoformen werden anfänglich in vereinzelt Zellansammlungen im Bereich der Visceralmasse und des Cephalopodiums exprimiert. Zellgröße und Lokalisation lassen vermuten, dass es sich dabei um Mesenchymzellen handelt. Nach der Torsion (nach dem 15-Stundenstadium) nimmt die Expression in der Visceralmasse ab, während sie sich in der Region des Cephalopodiums verstärkt. In älteren Veligerstadien (z.B. 72 und 130 Stunden)

erhöht sich die Expression in der Visceralmasse und in der Fußregion und kann gleichzeitig in den Statocysten nachgewiesen werden (Abb. 21 G-J). Im 130-Stundenstadium zeigen die Larven ein distinktes Expressionsmuster, wobei beide Isoformen hauptsächlich in drei Gewebetypen exprimiert werden: in der Visceralmasse, größtenteils auf der rechten Seite; in den beiden Statocysten; und innerhalb individueller Mesenchymzellen der Fußregion (Abb. 21 I-L).

Während der Larvalentwicklung sind die Expressionsmuster von HaH1 und HaH2 weitgehend gleich. In den juvenilen Tieren ist ebenfalls eine Co-Expression der beiden Isoformen zu verzeichnen, wobei sich diese aber hauptsächlich auf die Fußregion beschränkt. Ansonsten sind in den Juvenilen gewebsspezifische Expressionsmuster festzustellen. So wird beispielsweise im Eingeweidesack jede Isoform in unterschiedlichen Regionen exprimiert. HaH1 ist in der Spitze und in dem an das Herz angrenzenden Bereich des Eingeweidesackes nachweisbar, wohingegen HaH2-Transkripte in den übrigen Bereichen lokalisiert sind (Abb. 23 E, G). Auch im Dorsoventralmuskel werden beide Isoformen in unterschiedlichen Bereichen exprimiert (Abb. 23 C, D). In den Kiemen ist die Expression von HaH1 und HaH2 ebenfalls auf charakteristische Regionen beschränkt. HaH1 kommt ausschließlich in der Spitze der Lamellen und HaH2 an der Basis dieser Lamellen vor (Abb. 23 M, N). Manche Gewebe zeigen keinerlei HaH1 Expression, wohl aber eine hohe Expression von HaH2, so z.B. der Mundbereich (Abb. 23 F, H). Sehr markante Unterschiede bezüglich der Expressionsmuster zeigen sich zudem in den Tentakeln. HaH1 kann nur in den Kopftentakeln und in den Augenstielen nachgewiesen werden (Abb. 23 J), wobei es in den Epipodialtentakeln fehlt (Abb. 23 I). Dahingegen wird HaH2 sehr stark in den Epipodialtentakeln exprimiert (Abb. 23 K), aber nicht in den Kopftentakeln und nicht in den Augenstielen (Abb. 23 L). Die Abbildung 22 bietet einen Einblick in den Bauplan der Haliotidae und dient der Identifizierung der Signalloca.

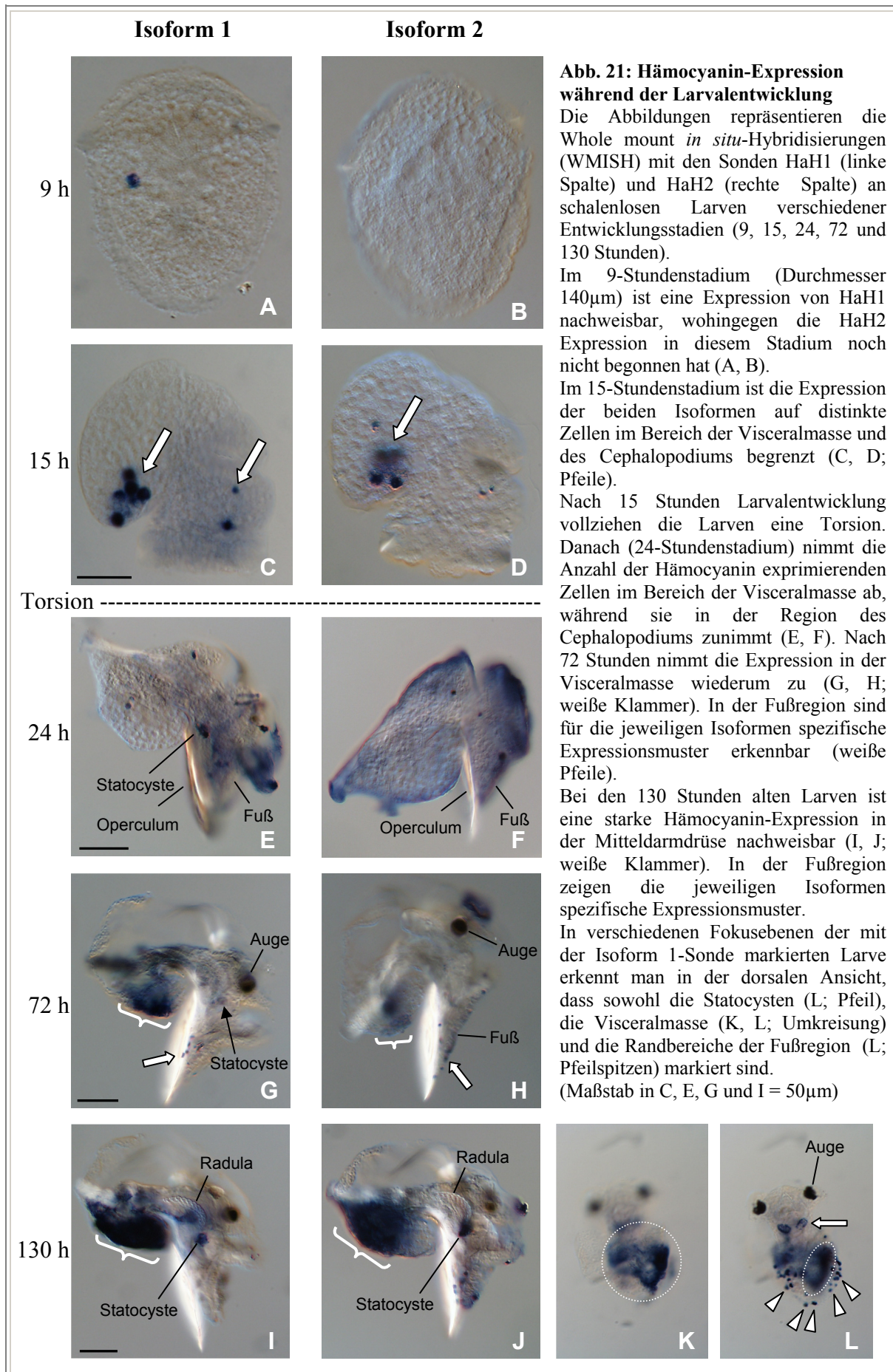




Abb. 22: *Haliotis* Bauplan (Mizzaro-Wimmer u. Salvini-Plawen)

A) Die Aufsicht zeigt eine Präparation, bei der die Schale entfernt wurde. B) Bei dieser Dorsal-Präparation wurden das rechte und hintere Mantelepithel, das Pericard und weitestgehend die Gonaden entfernt. Das Mantelraumdach wurde entlang der rechten Kieme längsgeschnitten und nach links geklappt.

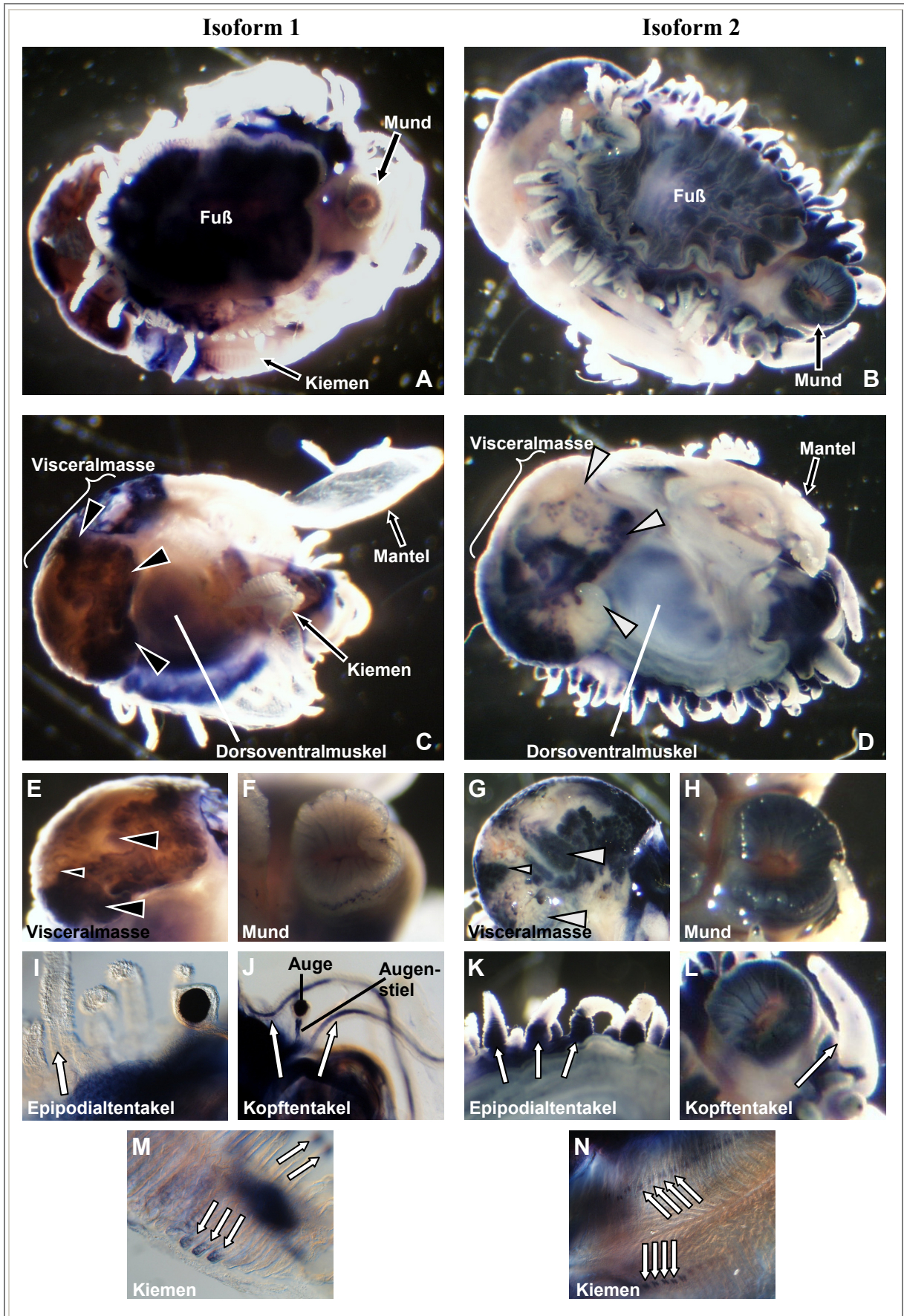


Abb. 23: Expression von HaH1 und HaH2 in ein Monat alten juvenilen Tieren

Die juvenilen Tiere sind etwa 0,8 cm groß. A) und B) zeigen eine ventrale Ansicht, bei C) und D) handelt es sich um eine dorsale Aufsicht. Die Präparate zeigen sowohl eine Co-Expression der beiden Isoformen als auch gewebspezifische Expressionsmuster. Eine Co-Expression ist hauptsächlich in der Fußregion zu verzeichnen (A, B). In manchen Geweben (z.B. im Mantel; C, D) wird keine Hämocyanin-mRNA detektiert. Innerhalb eines Gewebetyps (z.B. Eingeweidesack, Kiemen, Dorsoventralmuskel) kann in unterschiedlichen Regionen eine Hämocyanin-Expression nachgewiesen werden. So wird im Eingeweidesack HaH1 in der Spitze und in der ans Herz angrenzenden Region exprimiert (C, E; schwarze Pfeilspitzen), wohingegen HaH2 in den übrigen Regionen exprimiert wird (D, G; weiße Pfeilspitzen). Ein weiteres markantes Expressionsmuster zeigt sich in den Kiemen. Während HaH1 ausschließlich am äußeren Rand der Kiemen exprimiert wird (M), ist HaH2 nur im inneren Bereich der Kiemen detektierbar (N). Weitere auffällige Unterschiede in den Expressionsmustern zeigen die Epipodialtentakel und die Mundregion. Während HaH2 in diesen Geweben exprimiert wird, ist HaH1 in keinem dieser Bereiche nachweisbar (B, H, K). Im Gegensatz dazu ist HaH1 in den Kopftentakeln und in den Augenstielen zu finden (J), wohingegen hier keine HaH2-Expression stattfindet (L).

Im Anschluss an diese Untersuchungen wurden Versuche angestellt, die Expressionsmuster beider Isoformen parallel in einem Versuchsobjekt darstellen zu können. Dazu wurden wiederum isoformspezifische Sonden hergestellt, welche in diesem Fall mit unterscheidbaren chromogenen Substanzen bzw. verschiedenen Markierungen (Digoxigenin bzw. Biotin) versehen waren. Jedoch scheiterten die Versuchsreihen daran, dass ständig auftretende Hintergrundreaktionen der Farbstoffe die eigentlichen Signale überlagerten. Trotz einer Vielzahl von Versuchsansätzen, bei denen sämtliche Reaktionsbedingungen variiert wurden, gelang es nicht, auswertbare Präparate herzustellen.

1.2 Untersuchungen zur cDNA, Genstruktur und chromosomalen Lokalisation von Gastropoden-Hämocyanin

Von den vier Hämocyaninen HtH1 und HtH2 aus *Haliothis tuberculata* sowie KLH1 und KLH2 aus *Megathura crenulata* war lediglich von KLH2 die cDNA und deren korrespondierender Genbereich vollständig ermittelt. Von KLH1 und HtH2 waren auf cDNA- und Genebene die Sequenzbereiche bekannt, welche sich vom Exon a1 bis zur 3'UTR erstreckten. Die bereits analysierten cDNA- und Gensequenzen von HtH1 umfassten den für ein Signalpeptid kodierenden Abschnitt bis hin zur 3'UTR.

Im Rahmen meiner Arbeit sollten die bis dato noch nicht sequenzierten cDNA-Sequenzen von *M. crenulata* und *H. tuberculata* ermittelt werden. Dazu zählten vom KLH1 und HtH2 die Teilbereiche von der 5'UTR bis in die FU-a und vom HtH1 der Sequenzbereich von der 5'UTR bis in den für das Signalpeptid kodierenden Bereich. Zudem sollten die entsprechenden Gensequenzen inklusive Promotorregionen analysiert werden.

Im Folgenden wird die Bezeichnung „Klon“ gleichermaßen für klonierte DNA-Fragmente und DNA-Klone aus der genomischen Bank gewählt, da es sich bei allen um eine Population genetisch identischer DNA-Moleküle handelt.

1.2.1 Sequenzen und Genstrukturen der Hämocyanine KLH1 und KLH2

1.2.1.1 cDNA und Gen des KLH1

Über 5'RACE und RT-PCR konnte ein 350 bp Fragment (Klon „KLH1 5'UTR“, Tab. 3) amplifiziert werden, welches die cDNA-Sequenz der 5'-Region beinhaltet. Die komplette KLH1-cDNA hat eine Länge von insgesamt 10919 bp. Die Sequenz beginnt mit einer 5'UTR von 24 bp. Daran schließt sich der offene Leserahmen (open reading frame; ORF) mit 10245 bp an. Er besteht aus einem für ein Signalpeptid kodierenden Bereich von 48 bp und einer für 3399 Aminosäuren kodierenden Sequenz. Diese repräsentiert die Domänen FU-a bis -h, welche typischerweise bei Gastropoden vorgefunden werden (Lieb et al., 1999). Die 3'UTR hat eine Länge von 650 bp.

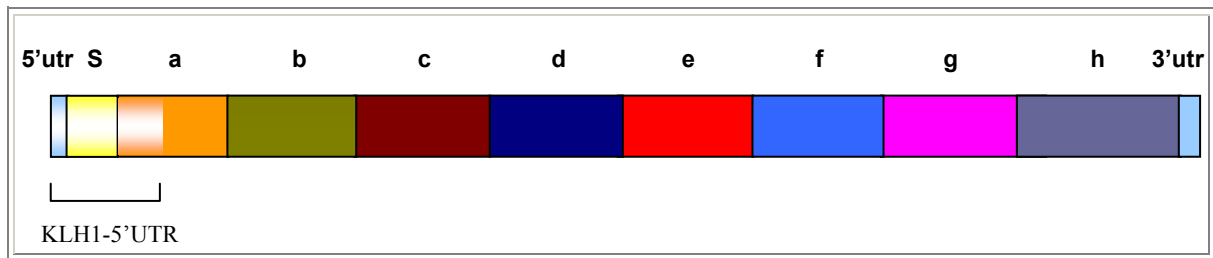


Abb. 24: Schematische Darstellung der KLH1-cDNA

Die Exons der verschiedenen FUs, der für das Signalpeptid (= S) kodierende Bereich und die UTR sind mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. Durch Klon „KLH1 5'UTR“ ist die KLH1-cDNA nun vollständig analysiert.

Durch Screening einer von mir erstellten genomischen Bank und mittels genomischer PCR wurde der entsprechende Genbereich bis auf die 24 bp der 5'UTR und die für das Signalpeptid 1 kodierenden 33 bp vervollständigt. Im Einzelnen konnte der Klon „KLH1-2c“ isoliert werden, der vom Intron S1/S2 bis in die Domäne a2 reicht und 9903 bp umfasst (Tab. 3). Er beinhaltet 4115 bp des Introns S1/S2, welches in Phase 0 ist, und einen für ein Signalpeptid kodierenden Teilbereich von 15 bp. Das darauf folgende Intron S2/a1 ist in Phase 1 und umfasst 4185 bp, das Exon a1 350 bp, das in Phase 0 liegende Intron a1/a2 1040 bp und die Teilsequenz des Exons a2 197 bp. Durch genomische PCR konnte ein Intronfragment amplifiziert werden (Klon „KLH1-MP35“, Tab. 3), welches weitere Sequenzdaten des Introns S1/S2 lieferte und einen Überlappungsbereich von 78 bp mit Klon „KLH1-2c“ aufweist. Aus einem anschließenden Sondenscreening resultierte der 5681 bp lange Klon „KLH1/1/1A“ (Tab. 3), der ein weiteres Teilstück des Introns S1/S2 beinhaltet. Das bisher analysierte Intron S1/S2 des KLH1 ist 10099 bp groß. Das komplette KLH1-Gen umfasst 17 Exons und 16 Introns (Abb. 29). Die Promotorsequenz konnte nicht identifiziert werden.

1.2.1.2 Der KLH2 Promotor beinhaltet eine TATA-Box

Die bereits komplett sequenzierte KLH2-cDNA hat eine Länge von insgesamt 10453 bp. Sie beginnt mit einer 5'UTR von 23 bp. Daran schließt sich der offene Leserahmen mit 10266 bp an. Er besteht aus einem für ein Signalpeptid kodierenden Bereich von 60 bp und der für die acht Domänen kodierenden Sequenz von 3402 Aminosäuren. Die 3'UTR hat eine Länge von 185 bp.

Durch Screening der genomischen Bank konnte der Klon „KLH2/3b-4“ (Tab. 3) ermittelt werden, der 900 bp der Promotorsequenz beinhaltet und 2144 bp ins Intron S1/S2 reicht.

Somit konnte neben der cDNA auch die Genstruktur von KLH2 komplett ermittelt werden. Das KLH2-Gen beinhaltet 17 Exons und 16 Introns. Neben der Anzahl der Exons und Introns stimmen auch die jeweilige Lage und Phase der Introns exakt mit denen des KLH1-Gens überein (Abb. 29). Damit weisen beide KLH-Gene eine identische Genstruktur auf. Der Promotorbereich des KLH2-Gens beinhaltet eine für regulierte Gene typische TATA-Box, die an Position -32 liegt.

PCR-Produkt / Klon	US-Primer	DS-Primer	Größe (bp)
KLH1 5'UTR	Universal Amplification Primer	PYWDW DS	350
KLH1 5'-Sonde	KLH1a gen US	PYWDW DS	279
KLH1 MP35	Signal3	KLH1 DS7	695
KLH1 5'-Intron -Sonde	KLH1 P US 7	KLH1 P DS9	176
KLH1 2c	Mit Sonde „KLH1 5'“ gescreent		9903
KLH1/1/1A	Mit Sonde „KLH1 5'-Intron“ gescreent		5681
KLH2 5'-Sonde	5'UTR US	KLH2 Intron DS	127
KLH2 2/3b-4	Mit Sonde „KLH2 5'“ gescreent		3118

Tab. 3: PCR-Produkte und Klone des KLH.

1.2.1.3 Chromosomale Lokalisation der KLH-Gene

Die Untersuchungen an Chromosomen von *M. crenulata* sollten aufklären, ob die unterschiedlich starke Expression der beiden Hämocyanin-Isoformen durch eine unterschiedliche Anzahl von Kopien der Hämocyanin-Gene begründet sein könnte. Über die chromosomale Organisation der Hämocyanin-Gene von *M. crenulata* war im Vorfeld meiner Untersuchungen nichts bekannt.

Zur allgemeinen Charakterisierung der Chromosomen wurden Giemsa-, DAPI- und Chromomycin A₃-Färbungen (CMA₃) angewandt. Giemsa färbt die DNA der Chromosomen einheitlich an. DAPI besitzt eine größere Bindungspräferenz für AT-reiche DNA-Regionen, wohingegen sich CMA₃ eher an GC-reichen Regionen anlagert. Die durchgeführten Färbemethoden zeigten keine spezifische Bänderung, sondern eine gleichmäßige Färbung (Abb. 25, Abb. 26 B). Bei den untersuchten *Megathura*-Spezies wurde anhand mitotischer Chromosomen stets der Karyotyp 2n = 32 ermittelt (Abb. 25).

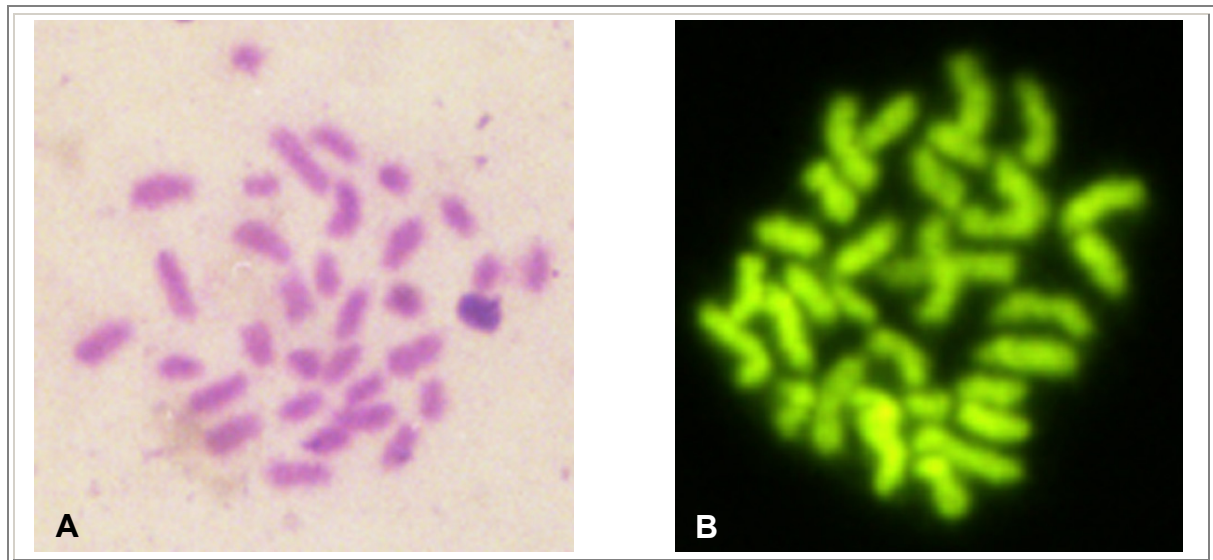


Abb. 25: Giemsa- und CMA₃-Färbung von mitotischen Chromosomen

In beiden Präparaten ist ein Chromosomensatz von $2n = 32$ feststellbar, eine Zuordnung homologer Chromosomen ist nicht möglich. In A) ist eine mit Giemsa angefärbte Probe dargestellt. Die Chromosomen in B) zeigen eine gleichmäßige Fluoreszenz nach Färbung mit CMA₃.

Die Untersuchungen meiotischer Präparate aus verschiedenen Versuchstieren ergaben jedoch, dass der Chromosomensatz von *M. crenulata* zwischen $n = 16$ und $n = 17$ Chromosomen variieren kann (Abb. 26). Ein detailliertes Karyogramm konnte anhand dieser Präparate nicht erstellt werden.

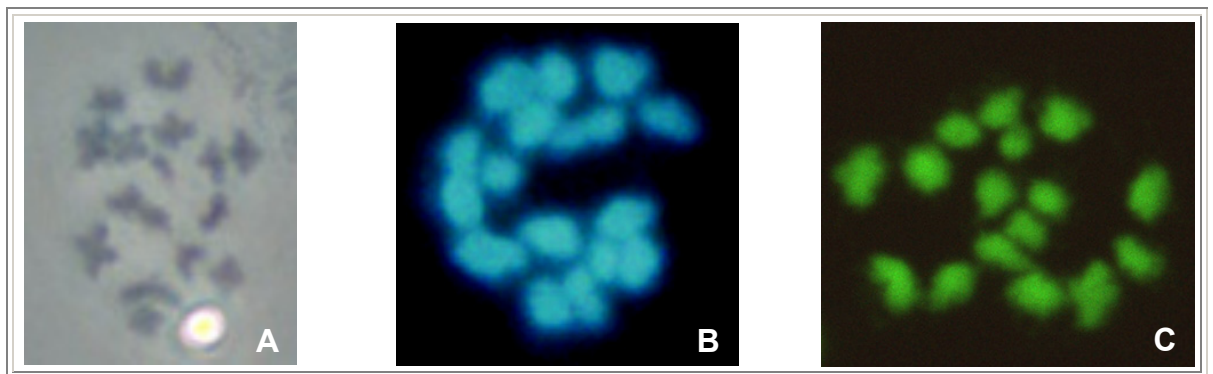


Abb. 26: Chromosomen in der Metaphase-I der Meiose

In der Phasenkontrastaufnahme (A) und in der Fluoreszenzaufnahme DAPI-gefärbter Chromosomen (B) sind 17 Chromosomen zu sehen. Das mit CMA₃-markierte Chromosomen-Präparat (C) hat den Karyotyp $n = 16$.

Um festzustellen, auf welchen Chromosomen die beiden Hämocyanin-Gene von *M. crenulata* lokalisiert sind und ob es sich dabei um Einzelkopiegene handelt, wurden Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen (FISH) mit isoformspezifischen DNA-Sonden durchgeführt (siehe Tab. 4 und Abb. 27).

PCR-Produkt	US-Primer	DS-Primer	Template /Plasmid	Größe (bp)
KLH1-h Sonde	KLH1-h US1	KLH1 UTR DS2	KLH1-h MP606	2381
KLH2-h Sonde	KLH2-h US1	KLH2 UTR DS	KLH2-h MP626	2436

Tab. 4: Digoxigenin markierte DNA-Sonden für die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung

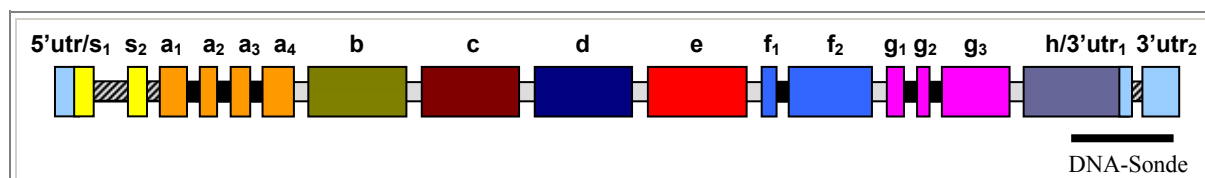


Abb. 27: Schematische Darstellung eines KLH-Gens

Die isoformspezifischen Sonden hybridisieren in einem intronüberspannenden Bereich von der FU-h bis zur 3'UTR.

Die FISH mit der Isoform 1-Sonde zeigt nur ein Signal (Abb. 28 A), obwohl in diesem Präparat mindestens zwei Signale zu erwarten gewesen wären. Aufgrund dessen wurden diese Versuchsansätze wiederholt. Weder konnten die Ergebnisse reproduziert, noch konnten die erwarteten zwei Signale identifiziert werden.

Bei der FISH mit der Isoform 2-Sonde erkennt man vier deutliche Signale (Abb. 28 B). Dies deutet auf zwei separate Genorte, eine weitere - bisher nicht identifizierte - Isoform oder eine Kreuzreaktion mit Isoform 1 hin.

Zusätzlich sollte mittels double-label-FISH analysiert werden, ob die Gene für die verschiedenen Hämocyanin-Isoformen auf einem gemeinsamen oder auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Diese Doppelmarkierung führte jedoch nicht zum Erfolg.

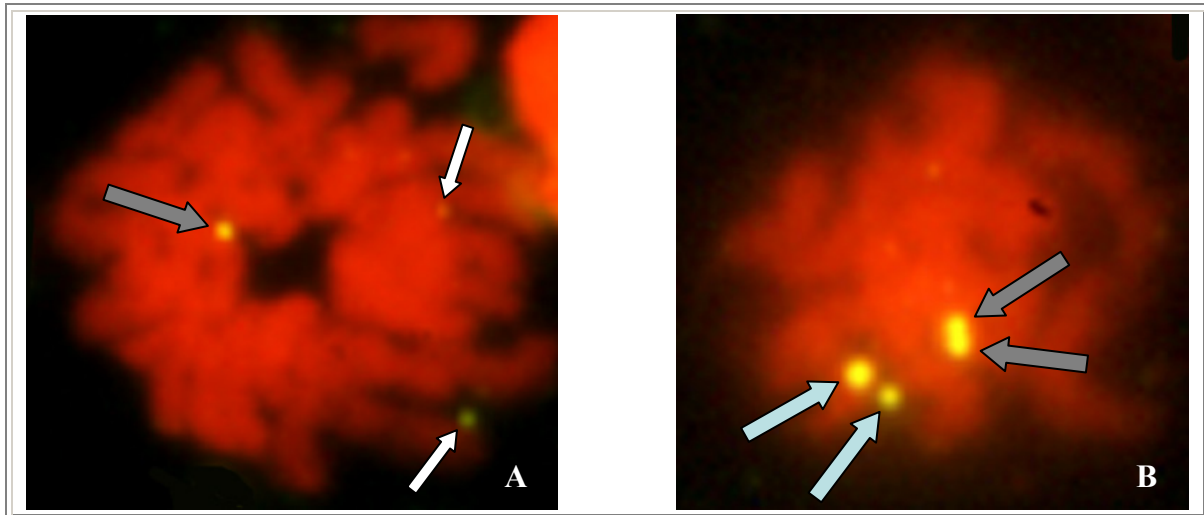


Abb. 28: Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen mit isoformspezifischen Hämocyanin-Sonden

A) FISH mit der Isoform 1-Sonde zeigt nur auf einem Chromosom ein Signal, obwohl auf dem homologen Chromosom ein weiteres Signal zu erwarten gewesen wäre. Die beiden schwächeren Signale (kleine weiße Pfeile) kommen durch Verunreinigungen zustande, was beim Fokussieren durch verschiedene Fokusebenen deutlich wurde. B) Bei der FISH mit der Isoform 2-Sonde sind vier Signale zu erkennen. Die Sonde hat demnach nicht nur an den beiden homologen KLH2-Genen gebunden, sondern auch noch an zwei weiteren Genen.

1.2.2 HtH- und KLH-Gene sind strukturell identisch

1.2.2.1 HtH1-Gen besteht aus 17 Exons und 16 Introns

Mittels 5'RACE konnte der Klon „HtH1/5“ (Tab. 5) amplifiziert werden, der die noch fehlenden Sequenzen der 5'UTR (20 bp) und die für das Signalpeptid kodierende Sequenz (51bp) vom HtH1 lieferte. Von der bis dato analysierten cDNA mit einer Länge von 10744 bp umfasst der ORF 10266 bp und kodiert für 3405 Aminosäuren der acht Domänen. Die daran anschließende 3'UTR ist 478 bp lang. Wie die KLH-Hämocyanin-Gene besitzt auch das HtH1-Gen 17 Exons und 16 Introns. Promotorsequenzen des HtH1-Gens konnten nicht ermittelt werden.

1.2.2.2 HtH2-Gen besitzt eine TATA-Box

Auch für die Isoform 2 des HtH konnten die cDNA-Sequenzen des 5'-Bereiches durch 5'RACE gewonnen werden. Das Fragment „HtH2/5'-a“ (Tab. 5) beinhaltet die Sequenz von der 5'UTR bis in die Domäne a1. Zusätzlich wurde über gPCR und „GenomeWalker“ die genomische Struktur des HtH2 komplettiert. Der Klon „HtH2/9“ (Tab. 5) beinhaltet die 5'UTR, einen für das Signalpeptid 1 kodierenden Bereich von 45 bp, 621 bp des Introns

S1/S2, welches in Phase 0 ist, und eine für das Signalpeptid 2 kodierende Sequenz von 19 bp. Das darauf folgende Intron S2/a1 ist in Phase 1 und umfasst 1620 bp, die Teilsequenz des Exons a1 beinhaltet 295 bp. Der Klon „HtH2 Promotor N1“ (Tab. 5) repräsentiert 181 bp der Promotorsequenz des HtH2-Gens, die 25 bp lange 5'UTR und einen Teil der für das Signalpeptid 1 kodierenden Sequenz. An Position -31 befindet sich die TATA-Box. Ein Sequenzalignment der beiden Klone „HtH2 Promotor N1“ und „HtH2/5'-a“, welche die 5'UTR beinhalten, ergab, dass die durch 5'RACE amplifizierte 5'UTR-Sequenz des Klons „HtH2/5'-a“ nicht vollständig war.

Die komplett analysierte HtH2-cDNA ist 10509 bp lang. Die 5'UTR umfasst 25 bp und der daran anschließende offene Leserahmen 10275 bp. Die für das Signalpeptid kodierende Sequenz macht 63 bp aus, und die daran anschließende Sequenz kodiert für 3404 Aminosäuren. Die 3'UTR ist 219 bp lang.

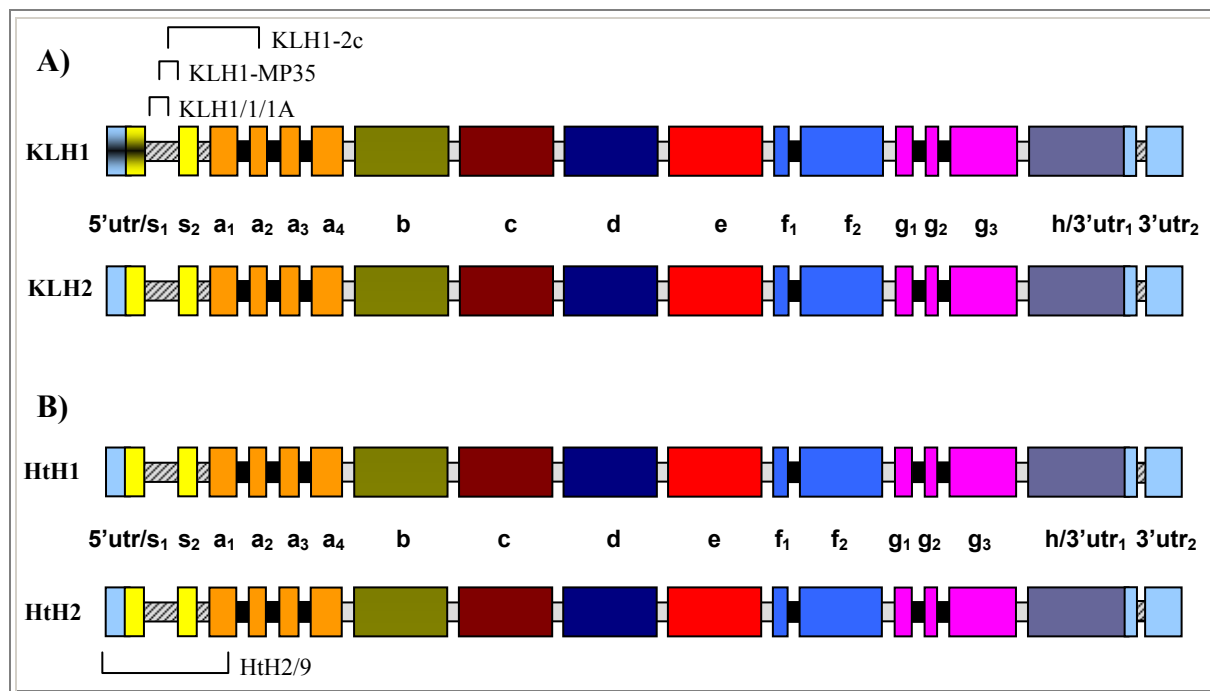


Abb. 29: Genstrukturvergleich zwischen KLH und HtH

Die Gene von KLH und HtH weisen die gleiche Intron/Exon-Struktur auf. Lage und Phase sowohl der internen als auch der Linker-Introns sind identisch. In A) und B) sind die genomischen Klone von KLH und HtH in ihrer ungefähren Lage angegeben. Der schwarz ausgefüllte 5'UTR/S1-Bereich von KLH1 deutet an, dass dieser noch nicht sequenziert ist. Linker-Introns sind grau und interne Introns schwarz dargestellt. Introns, welche innerhalb der 3'UTR und der Signalsequenz inserieren oder diese von der FU-a trennen, sind grau-schwarz gestreift.

PCR-Produkt / Klon	US-Primer	DS-Primer	Größe (bp)
HtH1/5'	Universal Amplification Primer	HtH1a Race DS	323
HtH2/5'-a	Universal Amplification Primer	HtH2a Race DS	373
HtH2/5'-Sonde	HtH2 P US1	HtH2 P DS1	226
HtH2/9	HtH2 P US1	HtH2a Race DS	2614
HtH2 Promotor N1	AP2	HtH2-GW-DS4	233

Tab. 5: PCR-Produkte und Klone des HtH

1.2.3 Das *Aplysia californica* Hämocyanin-Gen ist im Vergleich zu den KLH- und HtH-Genen stark fragmentiert

Von den vier analysierten Vetigastropoden-Hämocyanin-Genen konnten die Promotorbereiche des KLH2 und HtH2 ermittelt werden. Da weder für KLH noch für HtH der Promotor des Hämocyanin-Gens der Isoform 1 analysiert werden konnte, ist kein direkter Vergleich zwischen den Promotoren der beiden Isoformen möglich. Um dennoch detailliertere, vergleichende Promotoranalysen durchführen zu können, sollten Promotorbereiche von weiteren Gastropoden-Hämocyaninen ermittelt werden. Hierzu wurden die Genomprojekte von *Lottia gigantea*, *Biomphalaria glabrata* und *Aplysia californica* nach den entsprechenden Bereichen durchsucht (NCBI, Megablast). Für die ersten Beiden konnten keine Hämocyanin-Gene gefunden werden. Für *Aplysia californica* konnten hingegen 69 Fragmente aus dieser Genomdatenbank ermittelt werden. Ein Vergleich mit der in unserer Arbeitsgruppe bereits vollständig sequenzierten und analysierten *A. californica* Hämocyanin-cDNA (Lieb et al., 2004) zeigte, dass die Genombankdaten ca. 95% der 10239 bp umfassenden kodierenden Bereiche des Hämocyanin-Gens abdecken und 36768 bp der Intronsequenzen repräsentieren (siehe F 4.3). Die bisher bekannten Intronsequenzen machen mehr als 79,5% des gesamten Hämocyanin-Gens aus. Bis auf 4 kodierende Sequenzabschnitte, einen Teil der 5'UTR und einen 837 bp langen 3'UTR-Abschnitt, ist die komplette kodierende Sequenz des Gens durch Genbankdaten abgedeckt und damit die Lokalisation von Introns aufgeklärt. Promotorsequenzen konnten jedoch nicht identifiziert werden.

Da durch diese Recherche die Hämocyanin-Genstruktur von *A. californica* nahezu vollständig analysiert werden konnte, lag es nahe, diese mit bereits bekannten Hämocyanin-Genstrukturen zu vergleichen. Bisherige Analysen zeigten, dass die Hämocyanin-Gene von *M. crenulata* und *H. tuberculata* strukturell gleich sind (Altenhein et al., 2000, 2002; Lieb et

al., 2000, 2001; Streit, 2002). Ansonsten jedoch bestehen, bis auf die Organisation der Linker-Introns, keine strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den untersuchten Hämocyanin-Genen diverser Molluskengruppen wie z.B. Cephalopoden oder Bivalvia (Bergmann et al. 2006, 2007).

Da die Möglichkeit bestand, dass die *Aplysia*-Daten neue Erkenntnisse über die Evolution der Hämocyanin-Gene liefern könnten, wurden die noch fehlenden kodierenden Bereiche bzw. die noch unbekanntenen Intron/Exon-Übergänge mittels genomischer PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert.

PCR-Produkt / Klon	Lokalisation im Gen	US-Primer	DS-Primer	Größe (bp)
Aplysia A1	Ende Exon b1 bis Ende Exon b2	B US	DS 4	698
Aplysia F 13 MP6	Ende Exon b1 bis Ende Exon b3	B US	Exon-3 DS 3	1840
Aplysia D3/4	Mitte Exon d3 bis Ende Exon d4	D 3 US	DS 5	1139
Aplysia G1	Anfang Exon d4 bis Mitte Intron d4/5	US 5	DS 4/5	949
Aplysia H	Anfang Intron d/e bis Ende Exon e1	Intron d/e US	DS 6	1000
Aplysia I	Anfang Exon e1 bis Mitte Intron e1/2	US6	Intron e1/2 DS	427
Aplysia K	Endbereich 3'UTR	3'UTR US1	3'UTR DS	830

Tab. 6: PCR-Produkte und Klone des Ach

Das *Aplysia*-Hämocyanin-Gen besitzt 55 Introns (siehe Abb. 30 und Abb. 31). Sieben dieser Introns sind Phase 1-Linker-Introns. 45 Introns repräsentieren so genannte interne Introns (Lieb et al., 2002). Die für ein Signalpeptid kodierende Sequenz und die 3'UTR werden durch jeweils ein Intron unterbrochen. Die bisher untersuchte 5'UTR beinhaltet ein weiteres Intron. Da die 5'UTR jedoch nicht vollständig amplifiziert und analysiert werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass sich in diesem Genbereich noch weitere Introns befinden. Folgende Abbildung zeigt schematisch die Hämocyanin-Genstruktur von *A. californica*.

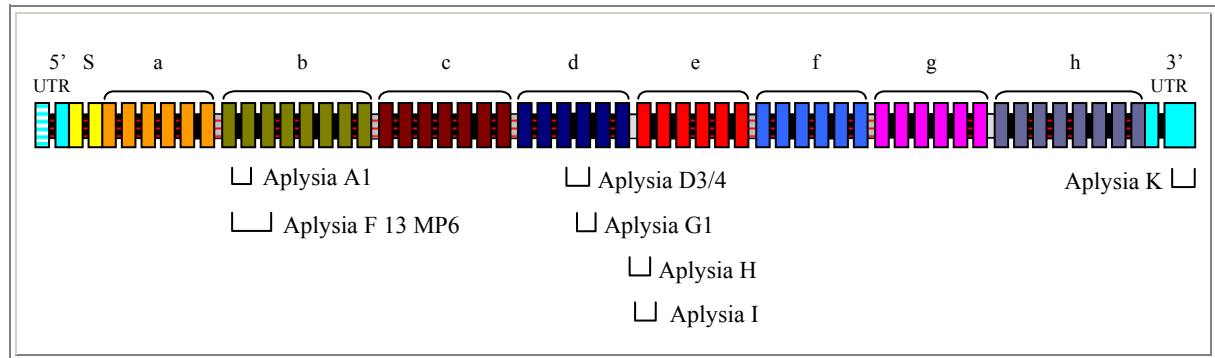


Abb. 30: Genstruktur des Hämocyanins von *Aplysia californica*

Diese schematische Darstellung zeigt die Struktur des *Aplysia californica*-Hämocyanin-Gens. Die Exons der verschiedenen FUs, der für das Signalpeptid (= S) kodierende Bereich und die UTR sind mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. Die mittels gPCR amplifizierten Klone sind in ihrer ungefähren Lage angegeben. Sequenzierte interne Introns sind schwarz, Linker-Introns grau markiert. Rotgestreifte Intronbereiche und die türkisgestreifte 5'UTR konnten nicht oder nur teilweise sequenziert werden, wobei jedoch alle Intron/Exon-Übergänge aufgeklärt werden konnten.

Bis auf wenige Ausnahmen inserieren alle internen AcH-Introns an spezifischen Protosplice Stellen, welche die Konsensussequenz AG|GT besitzen. Die Introns beginnen an der 5'-Splice Stelle jeweils mit einem GT-Duplett und schließen bis auf wenige Ausnahmen am 3'-Intronende mit einem CAG-Triplett ab (Abb. 31). Damit folgen alle Introns der so genannte GT-AG-Regel (Jackson, 1991; Long et al., 1998; Qiang et al., 1999; Wu & Krainer, 1999; Lund et al., 2002).

	Exon	Intron	Exon	Phase	Exongröße (bp)
AcH 5'UTR1/2 AcH s1/s2	AGAAAA CTTCTG - (511+) - CTTTAA GTGAGT - (1580+) - CCACAG	CACCGC CTGGCT	0	
AcH a1/a2 AcH a2/a3 AcH a3/a4 AcH a4/a5 AcH a5/a6 AcH a6/b1	CCAAAG CAGCAG CCCAGA CTACAG GTGGAG CTGACC	GTATGT - (600+) - TCCAG GTCAGG - (721+) - CCATAG GTAAGT - (1132+) - TCACAG GTAAGC - (511+) - TTTCAG GTATAA - (687) - TTTCAG GTAAGT - (720+) - CCACAG	GTCTGA GTGGCT AAGGAG CTACGA CTTTGT CTCCCA	1 0 1 2 0 1	a1 247 a2 194 a3 253 a4 139 a5 136 a6 271
AcH b1/b2 AcH b2/b3 AcH b3/b4 AcH b4/b5 AcH b5/b6 AcH b6/b7 AcH b7/b8 AcH b8/c1	TTCCAG GTACAG AGAGAA TTTGAG GTACAG AAGCCG CTACAG GGGATA	GTACGT - (509) - CCTCAG GTGAGA - (984) - TTTTAG GTGAGG - (1259+) - TCCTAG GTAAGA - (895+) - CTACAG GTCAGT - (829) - TTCTAG GTAAGT - (248) - TTCCAG GTAATT - (1201+) - TTACAG GTGGAA - (70+) - ATCCAG	AATGAC GTTGAA CGGCGA GTCCAG AGGAAA CTCTTG ATTCGA TTCTGC	0 0 2 0 2 1 2 1	b1 128 b2 150 b3 119 b4 178 b5 164 b6 275 b7 115 b8 146
AcH c1/c2 AcH c2/c3 AcH c3/c4 AcH c4/c5 AcH c5/c6 AcH c6/c7 AcH c7/d1	GCACAG TTACAG AAGCAG TGGCAG TTCCAG CTGCAA GAACAA	GTAATA - (857+) - TTCCAG GTCAGT - (855+) - TCACAG GTAAGC - (934+) - TCCAG GTCAGT - (905+) - TGACAG GTACAT - (431) - GTGTAG GTGAGT - (536+) - CCATAG GTAAGC - (770+) - CCAAAG	ACTTCT TGGCCA GTGCTG GCTCTC GTATTC GAGCGA GTCAGC	2 2 0 0 0 2 1	c1 238 c2 165 c3 100 c4 189 c5 141 c6 176 c7 233
AcH d1/d2 AcH d2/d3 AcH d3/d4 AcH d4/d5 AcH d5/d6 AcH d6/e1	GAGCAG CACCAG TGACAG ATACAG AACAAG GATCTA	GTATGC - (698+) - GTCCAG GTACGA - (438+) - CCACAG GTGAGT - (912) - GTCCAG GTGAGA - (892) - CACCAG GTGCTC - (658+) - CATCAG GTAAGT - (837) - TAACAG	GTGGAG AGACCC GATTTG CCGTCC GCCGGA ACGAGA	0 2 2 2 0 1	d1 257 d2 185 d3 216 d4 144 d5 229 d6 220
AcH e1/e2 AcH e2/e3 AcH e3/e4 AcH e4/e5 AcH e5/e6 AcH e6/f1	CAAAG GTACAG ATGAGG TTGCTG GATCAA CCCAAC	GTATTT - (636) - CAACAG GTAATA - (263) - GTTCAG GTACCT - (364+) - TAACAG GTGAGT - (1041+) - CCCAG GTAAGT - (601) - CATCAG GTGAGT - (883+) - CTTCAG	GTACGC GGTGAC GTCCCC GTTTCC CTGATC ATGACT	2 0 0 1 0 1	e1 199 e2 259 e3 312 e4 199 e5 158 e6 127
AcH f1/f2 AcH f2/f3 AcH f3/f4 AcH f4/f5 AcH f5/f6 AcH f6/g1	TTGCAG GATGAG TTTGAG TACCAT TGTCTG CTGTTG	GTAATG - (1242+) - AACAAAG GTGAGT - (234) - GTCCAG GTAAAA - (898+) - TCACAG GTAAGC - (432) - CCGCAG GTGAGT - (834+) - CGACAG GTGAGT - (826+) - CCCAG	GTGGAG GTGGTC GTTTCAG GGACCA AGGAAC GTGCCCT	0 0 0 2 0 1	f1 254 f2 126 f3 165 f4 263 f5 196 f6 253
AcH g1/g2 AcH g2/g3 AcH g3/g4 AcH g4/g5 AcH g5/g6 AcH g6/h1	TTTGCA GCACAG TTTGAA CGACAG TTGCTG TCAAGG	GTGAGT - (693) - TCCAG GTACAC - (498) - CCCAG GTAAGT - (631) - CCCAG GTAAGG - (368) - CTCCAG GTGAGT - (588+) - TCACAG GTAAGA - (398) - ACAAG	AGCATC GGCGCC GTCCAG ATTCAA GTACAT GTTACT	0 0 0 2 1 1	g1 146 g2 141 g3 234 g4 299 g5 179 g6 210
AcH h1/h2 AcH h2/h3 AcH h3/h4 AcH h4/h5 AcH h5/h6 AcH h6/h7 AcH h7/h8 AcH h8-3'UTR1/2	CTCAG AATCAG TGGCAG TATGAG TTTGAT GTCAAG CCTAAG AGCAAG	GTATGG - (471) - CCCAG GTAAT - (984+) - CCCAG GTAAGG - (1043+) - TCCAG GTAAGG - (1159+) - TTCTAG GTAAGT - (352) - CTGCAG GTGAGA - (798) - GAACAG GTAACA - (319+) - TTTCAG GTCAGC - (1032) - TTTCAG	GCATGC GACACC CAACTG TTCGAC GTCCAC ATTGGA ACTGTT CTTCAC	1 0 0 0 0 0 0 0	h1 225 h2 191 h3 264 h4 168 h5 129 h6 159 h7 144 h8 237

Abb. 31: Introneigenschaften des *Aplysia californica*-Hämocyanin-Gens

Alle Linker-Introns sind in Phase 1. Die internen Introns weisen eine Präferenz für Phase 0 auf (58%). Der Großteil der internen Introns inseriert an spezifischen Protosplice Stellen, welche die Konsensussequenz AG|GT besitzen. Alle Introns beginnen mit einem GT-Duplett und enden meist mit einem CAG-Triplett. Die bisher analysierten Intronbereiche umfassen mehr als 39768 bp, gegenüber 50007 bp des kompletten Gens (>79,5%). Introngrößen sind in Klammern dargestellt („+“ symbolisiert partiell sequenzierte Introns).

Aus den genomischen PCRs resultierten u.a. zwei Fragmente (Klon „Aplysia G1” und „Aplysia H”), die Unterschiede zu der bekannten cDNA-Sequenz aufweisen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons „Aplysia G1”, der die Sequenz des Exons d4 beinhaltet, stimmt nur zu 92% mit der bisher bekannten Sequenz überein (siehe Tab. 7). Die Aminosäuresequenz des Exons e1, die aus dem Klon „Aplysia H” abgeleitet wurde, zeigt lediglich eine Identität von 84% zu der bekannten Aminosäuresequenz des AcH-e1.

Durch die Analyse der Sequenzdaten aus der Genomdatenbank konnten 11 Klone ermittelt werden, die Abweichungen zu den bekannten cDNA-Sequenzen aufweisen. Es wurden somit insgesamt 13 Klone identifiziert, deren Sequenzen von den bekannten AcH-Sequenzen abweichen. Die Unterschiede der abgeleiteten Aminosäuresequenzen variieren zwischen 2% und 20% (siehe Tab. 7). In den meisten Fällen beruhen die Unterschiede auf isofunktionellen Aminosäureaustauschen.

Exon	Accession-Nr. / Klon	Aminosäureanzahl	Identität der abgeleiteten AS-Sequenz in %	Isofunktionelle Austausche	Funktionelle Austausche
C6	TI 1162340517	57	86	6	2
D1	TI 1142905831	85	95	3	1
D2	TI 1185474311	61	95	2	1
D3	TI 1159376228	71	97	1	1
D4	Klon G1	47	92	3	1
D5	TI 1159146748	76	96	2	0
D6	TI 1149776180	73	80	13	2
E1	Klon H	65	86	6	3
F2	TI 1161185976	42	95	0	2
F3	TI 1150284909	55	91	4	1
G6	TI 1151730105	69	90	4	3
H1	TI 1165781605	74	92	5	1
H2	TI 1155353086	63	94	3	1

Tab. 7: Identitätsvergleich der Aminosäuresequenzen, die aus den bekannten cDNA-Sequenzen und den neu identifizierten AcH-Sequenzen abgeleitet sind

Diese Auflistung zeigt alle Klone, die Abweichungen zur bekannten cDNA aufweisen. Die jeweiligen Identitäten variieren zwischen 80% und 98%. Die Klone „TI 1149776180” und „Aplysia H” beinhalten Sequenzen des Introns d6/e1. Diese überlappen und stimmen zu 100% überein. Gleiches gilt für die Klone „TI 1165781605” und „TI 1155353086”, die das Intron h1/h2 repräsentieren.

2. Hämocyanin-Sequenzen als phylogenetischer Marker

Sequenzdaten, die im Zusammenhang mit der *in situ*-Hybridisierung an *H. asinina* analysiert wurden, erwiesen sich im Vergleich mit den entsprechenden *H. tuberculata* Sequenzen als geeignet, um die beiden Arten phylogenetisch zu unterscheiden (Abb. 20). Aufgrund dessen wurde unser Augenmerk auch auf die Untersuchung des phylogenetischen Informationsgehalts der Hämocyanin-Sequenzen gelegt. Es wurden Hämocyanin-Teilsequenzen verschiedener *Haliotis*-Arten analysiert, um deren Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Familie der Haliotidae zu rekonstruieren.

2.1 Molekularphylogenetische Analyse der Gattung *Haliotis*

Da die gesamte cDNA-Sequenz der Mollusken-Hämocyanine mehr als 10 Kb umfasst und die bisher analysierten Gene fast doppelt so groß sind, wurde für die phylogenetischen Analysen nur ein kleines genomisches Segment der Isoform 1 herangezogen (Abb. 32). Durch den Einsatz eines spezifischen Primerpaares, das aus der Hämocyanin-Sequenz von *H. tuberculata* abgeleitet wurde, konnten für insgesamt 12 Spezies (*H. tuberculata*, *H. asinina*, *H. midae*, *H. diversicolor*, *H. fulgens*, *H. cracherodii*, *H. wallalensis*, *H. gigantea*, *H. rufescens*, *H. corrugata*, *H. discus supertexta*, *H. discus hannai*) einzelne Fragmente amplifiziert werden. Diese umspannen 522 bp bis 657 bp und repräsentieren Teilsequenzen der FU-f und FU-g inklusive des dazwischenliegenden Linker-Introns. Alle Fragmente wurden kloniert und sequenziert. Die Primersequenzen wurden bei den anschließenden phylogenetischen Analysen nicht miteinbezogen.

Das Sequenzalignment zeigt, dass die 5' und 3' Splice Stellen im Hinblick auf die Position und die Phase hoch konserviert sind (Abb. 32). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen, die durch die Exons f und g kodiert werden, sind ebenfalls hoch konserviert. Die Ähnlichkeiten der kodierenden Nukleotidsequenzen betragen 80% bis 99%. Die Intronlängen variieren zwischen 270 bp und 405 bp, deren Ähnlichkeiten zwischen 58% und 95%.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den amplifizierten Genabschnitten tatsächlich um die orthologen Typ 1 Hämocyanine der untersuchten Haliotidae handelt, wurden verschiedene Stammbäume rekonstruiert. Dazu wurde die „Bayesian Inference“-Methode mit unterschiedlichen Substitutionsmodellen verwendet (z.B. „JTT“, „Dayhoff“ und „WAG“). Unabhängig davon, ob die multiplen Sequenzalignments auf den Hämocyanin-Gensequenzen (inklusive Intronsequenzen) oder ausschließlich auf den proteinkodierenden Sequenzen basieren, weisen die daraus resultierenden Stammbäume immer die gleiche Topologie auf.

Die Stammbäume differieren lediglich durch leichte Abweichungen in den Unterstützungswerten (posterior probabilities) einiger Knoten. Die Rekonstruktion mit den besten Unterstützungswerten lieferte die Analyse, der die gesamten Gensequenzdaten zugrunde liegen (Abb. 33). Zum „Wurzeln“ dieses Stammbaumes wurden die Sequenzen der Isoform 2 von *M. crenulata*-Hämocyanin (KLH2) und *H. tuberculata*-Hämocyanin (HtH2) verwendet.

Aus den errechneten Stammbäumen wird klar ersichtlich, dass sich die orthologen Isoform 1 Hämocyanine mit einem Unterstützungswert von 100 zusammengruppiert und klar von den paralogen Isoform 2-Hämocyaninen (KLH2 und HtH2) separieren. Ferner sind anhand dieser Analysen zwei monophyletische Subgruppen der Haliotidae zu erkennen, in denen sich darüber hinaus einige gut unterstützte Schwestergruppenverhältnisse herauskristallisieren (Abb. 33).

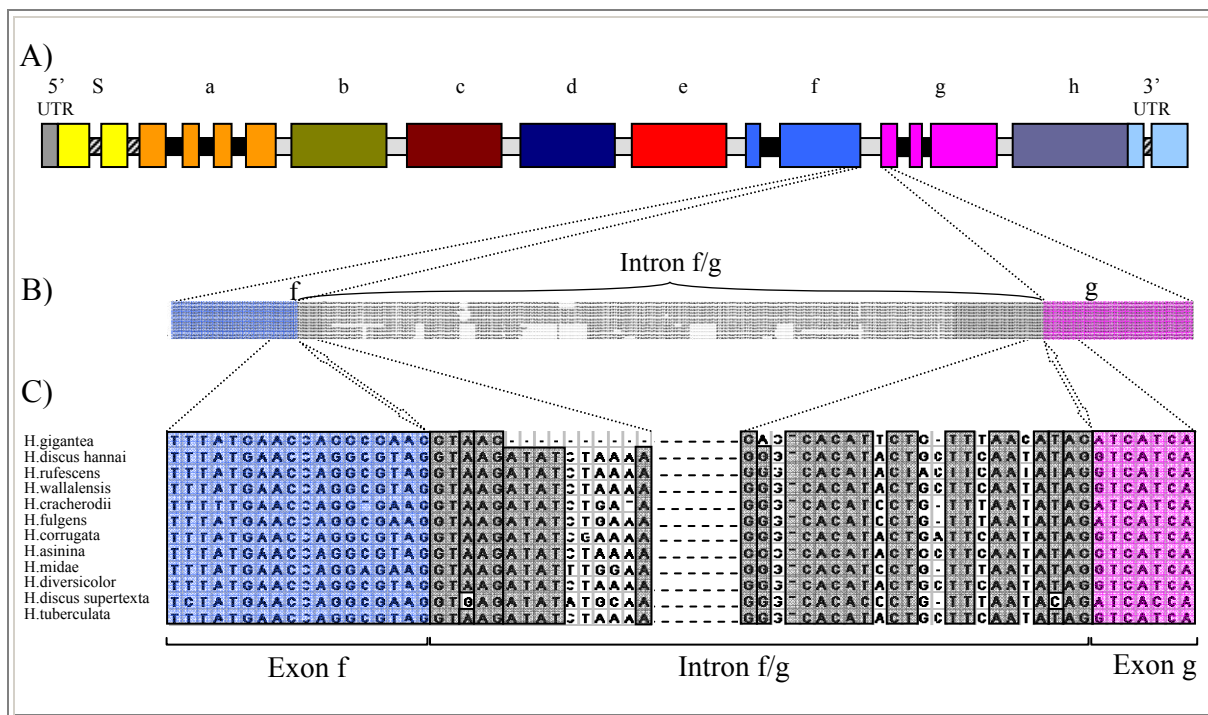


Abb. 32: Genarchitektur und Sequenzalignment der verschiedenen *Haliotis*-Arten

A) Schematische Darstellung des Hämocyanin-Gens von *Haliotis tuberculata* (HtH1). Die grauen Balken repräsentieren sehr ursprüngliche Linker-Introns, welche die paralogen, funktionellen Domänen voneinander trennen. B) Das Alignment der amplifizierten Isoform 1 Genabschnitte der *Haliotis*-Hämocyanine umfasst Teile der Exons f und g sowie das Intron f/g. Die Exons sind hoch konserviert, wohingegen die Intronsequenzen variabler sind und signifikante Indels aufweisen. C) Die detaillierte Ansicht der 5'- und 3'-Splice Stellen (weiße Pfeile) veranschaulicht, dass diese Bereiche auch einen sehr hohen Konservierungsgrad aufweisen, und dass das Splicing der meisten Introns der AG/GT-Regel folgt.

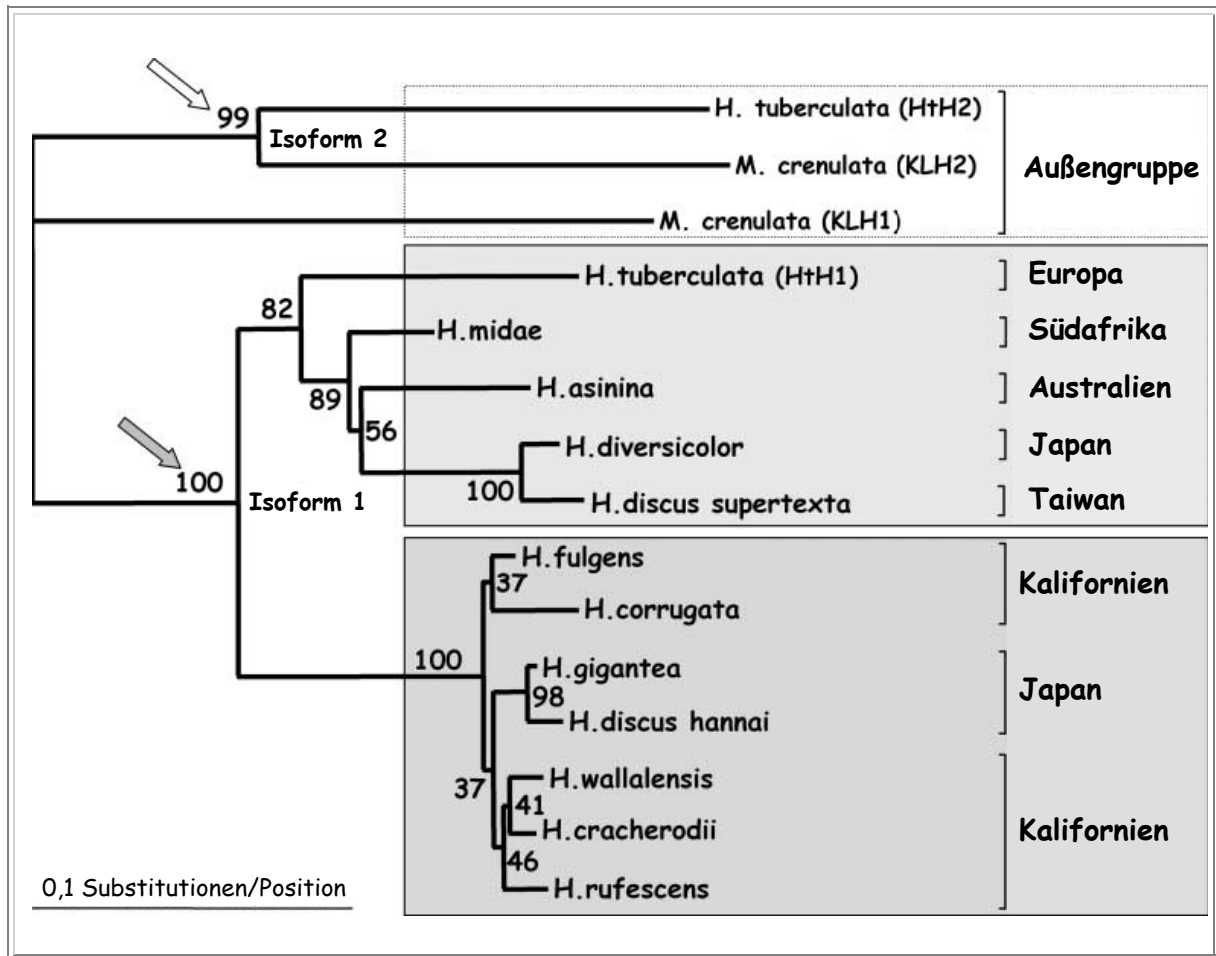


Abb. 33: Phylogenie der Haliotidae

Der Stammbaum wurde, basierend auf einem Nukleotidalignment, mit der Bayesianischen Methode (MrBayes) rekonstruiert (ngen = 60000, burnin = 4000). Die Isoform 2-Hämocyanine von *Haliotis tuberculata* und *Megathura crenulata* (HtH2 und KLH2) sind näher miteinander verwandt als die zwei Isoformen einer Spezies. Das lässt darauf schließen, dass die beiden Isoformen durch Genduplikation entstanden sind, bevor sich die beiden Familien getrennt haben, und es sich dementsprechend um orthologe Proteine handelt. Alle weiteren sequenzierten Fragmente gruppieren sich als Isoform 1-Orthologe zusammen, wobei KLH1 als Vertreter der Fissurellidae basal eingeordnet wird. Die Hämocyanine von *H. tuberculata*, *H. midae*, *H. asinina*, *H. diversicolor* und *H. discus* gruppieren sich als Schwestergruppe zu den übrigen Haliotidae.

2.2 Molekularphylogenetische Analyse der Polyplacophoren

Die Artenanalyse innerhalb der Familie der Haliotidae machte deutlich, dass Hämocyanin-Sequenzen ein adäquater phylogenetischer Marker sind, um intrafamiliäre Verwandtschaftsverhältnisse aufzuklären. Darauf basierend sollte versucht werden, die auf Hämocyanin gestützten phylogenetischen Untersuchungen auf interfamiliäre Ebene auszuweiten. Durch meine Studien am Hämocyanin verschiedener Gastropoden-Familien (z.B. Turbinidae, Fissurellidae, Haliotidae, Trochidae) zeigte sich, dass interfamiliäre Sequenzidentitäten derart gering sind, dass keine Isoform- bzw. FU-spezifischen Primer abzuleiten waren. Da die Verwendung von Hämocyanin als phylogenetischer Marker auf höheren taxonomischen Ebenen getestet und etabliert werden sollte und in den bisher untersuchten Polyplacophoren (Chitonen) nur eine Hämocyanin-Isoform nachgewiesen werden konnte (Fitsch, 2001), wurden weiterführende Untersuchungen an dieser sehr ursprünglichen Molluskengruppe durchgeführt. Zudem sind molekularphylogenetische Studien an Chitonen von großem Interesse, da deren Phylogenie kontrovers diskutiert wird und bisher hauptsächlich morphologische Untersuchungen vorliegen.

Es sollten, wie auch schon bei den phylogenetischen Untersuchungen der Haliotidae (Streit et al., 2005), die Gensequenzabschnitte der FU-f bis -g amplifiziert und für entsprechende Analysen herangezogen werden (Abb. 32 A). Da von den Chitonen keine Sequenzinformationen aus diesem Genbereich bekannt waren, konnten die PCRs nicht mit einem spezifischen Primerpaar durchgeführt werden. Um den gewünschten Sequenzabschnitt zu erhalten, wurden zuerst PCRs durchgeführt, in denen degenerierte Primer kombiniert wurden, die in den konservierten Bereichen „PYWDW” und „WAIWQ” der Kupferbindungsstelle A binden. Die daraus resultierenden Fragmente sind zwischen 370 bp und 400 bp lang. Bei den FUs a, b, c, e und f umfassen diese Sequenzbereiche ca. 400 bp. Die FU-d hat eine Deletion von 10 bp und ist demnach nur 390 bp lang. Die FU-g und FU-h sind mit 370 bp um etwa 30 bp kürzer. Dadurch konnten die Fragmente der FU-g und -h schon anhand des Größenunterschiedes im Agarosegel von den übrigen 6 FUs unterschieden werden. Die ausgewählten PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert. Durch multiple Sequenzvergleiche mit bereits bekannten Hämocyanin-Sequenzen konnten diese Fragmente letztlich eindeutig den orthologen FUs zugeordnet werden. Anschließend konnte aus den Sequenzen, die der FU-f zugewiesen wurden, ein degenerierter Polyplacophoren-Primer („Hc-FS-F-US”) im C-terminalen Bereich der FU-f gewählt werden. Dieser wurde mit dem degenerierten Hämocyanin-Primer „WAIWQ-DS” kombiniert, was bei 11 Arten zum gewünschten Fragment führte. Für 6 weitere Arten konnten spezifische Primer generiert

werden, die in Kombination mit den degenerierten Hämocyanin-Primern die definierten Fragmente hervorbrachten.

A)			
PCR-Produkt / Klon der FU-f/g	US-Primer	DS-Primer	Größe (bp)
<i>Lepitochitona cinerea</i> (55)	Hc-FS-F US	WAIWQ DS	1094
<i>Nuttallina fluxa</i> -1 (89)	Hc-FS-F US	Ch55-g DS	819
<i>Nuttallina fluxa</i> -2 (89)	Nuttallina-for-g	WAIWQ DS	578
<i>Lorica volvox</i> -2 (92)	Hc-FS-F US	Ch-92-g DS	805
<i>Lorica volvox</i> -1 (92)	PYWDW US	WAIWQ DS	369
<i>Loricella angasi</i> (95)	Hc-FS-F US	WAIWQ DS	2151
<i>Onithochiton hirasei</i> (98)	Hc-FS-F US	WAIWQ DS	1236
<i>Cryptoplax iredalei</i> (99)	Hc-FS-F US	WAIWQ DS	1359
<i>Nierstraszella lineata</i> -2 (100)	PYWDW US	WAIWQ DS	1987
<i>Notoplax conica</i> (101)	Hc-FS-F US	WAIWQ DS	1121
<i>Nuttallochiton mirandus</i> (105)	Hc-FS-F US	WAIWQ DS	1238
<i>Callochiton bouveti</i> -1 (106)	WAIWQ US	Ch-106-g DS	1095
<i>Callochiton bouveti</i> -2 (106)	PYWDW US	WAIWQ DS	368
<i>Plaxiphora aurata</i> (108)	Hc-FS-F US	WAIWQ DS	1183
<i>Tonicia chilensis</i> (169)	Hc-FS-F US	WAIWQ DS	1326
<i>Leptochiton alascensis</i> (250)	PYWDW US	WAIWQ DS	374
<i>Leptochiton alascensis</i> (250)	WAIWQ US	Ch-250-g DS	1383
<i>Stenosemus albus</i> (281)	Hc-FS-F US	WAIWQ DS	1083
<i>Lepidozona interstincta</i> (298)	Hc-FS-F US	WAIWQ DS	1117
<i>Hanleyella oldroydi</i> (306)	PYWDW US	WAIWQ DS	394
<i>Hanleyella oldroydi</i> (306)	Ch-306-f US	WAIWQ DS	1664
<i>Acanthochiton fascicularis</i>	Hc-FS-F US	WAIWQ DS	1091
B)			
PCR-Produkt / Klon der FU-d	US-Primer	DS-Primer	Größe (bp)
<i>Lepitochitona cinerea</i> -2 (55)	PYWDW US	WAIWQ DS	386
<i>Nierstraszella lineata</i> -1 (100)	PYWDW US	WAIWQ DS	386
<i>Callochiton bouveti</i> -3 (106)	PYWDW US	WAIWQ DS	386
<i>Tonicella marmorea</i> -1 (286)	PYWDW US	WAIWQ DS	386
<i>Chorioplax grayi</i>	PYWDW US	WAIWQ DS	386

Tab. 8: PCR-Produkte und Klone der analysierten Polyplacophoren-Arten

A) Für 17 Arten konnten die genomischen Sequenzen der FUs f/g (inklusive Linker-Intron) amplifiziert werden. Die beiden Klone von *Callochiton bouveti* und *Leptochiton alascensis* weisen jeweils einen Überlappungsbereich von etwa 75 bp auf. Zusammengefügt umspannen sie die 1395 bp bzw. 1677 bp langen Sequenzen von der Kupferbindungsstelle „WAIWQ“ der FU-f bis zu „WAIWQ“ in der FU-g. Von *Nuttallina fluxa* und *Lorica volvox* existieren ebenfalls zwei Fragmente, die einen Überlappungsbereich von 263 bp bzw. 68 bp aufweisen. Die zusammengefügten Sequenzen sind 1134 bp lang und reichen vom C-terminalen Bereich der FU-f bis „WAIWQ“ in der Kupferbindungsstelle A der FU-g. Die beiden Fragmente von *Hanleyella oldroydi* haben eine Überlappung von 106 bp und decken den 1952 bp langen Sequenzbereich von „PYWDW“ der Kupferbindungsstelle A in der FU-f bis zu „WAIWQ“ in der FU-g ab. B) Genomische Fragmente (ohne Intron), die der FU-d zugeordnet wurden.

Insgesamt wurden Fragmente von 17 Arten (*Lepitochitona cinerea*, *Nuttallina fluxa*, *Lorica volvox*, *Loricella angasi*, *Onithochiton hirasei*, *Cryptoplax iredalei*, *Nierstraszella lineata*, *Notoplax conica*, *Callochiton bouveti*, *Nuttallochiton mirandus*, *Plaxiphora aurata*, *Leptochiton alascensis*, *Tonicia chilensis*, *Stenosemus albus*, *Lepidozona interstincta*, *Hanleyella oldroydi*, *Acanthochiton fascicularis*) amplifiziert, kloniert und sequenziert, welche die Teilsequenzen der FU-f und FU-g, inklusive des dazwischenliegenden Linker-Introns repräsentieren (Längen zwischen 1083 bp und 2151 bp). Die Sequenzen der Introns variieren mit einer Länge von 157 bp bis 1297 bp.

Von 5 Arten (*Lepidochitona cinerea*, *Callochiton bouveti*, *Tonicella marmorea*, *Chorioplax grayi* und *Nierstraszella lineata*) wurden zudem 386 bp lange Teilsequenzen der FU-d isoliert, die im Bereich der Kupferbindungsstelle A liegen.

In die Sequenz- und Stammbaumanalysen wurden die Primersequenzen nicht miteinbezogen. Auch die Intronsequenzen wurden vernachlässigt, da deren Größen von 157 bis 1297 bp zu divergent sind. Die phylogenetische Rekonstruktion (Abb. 34) zeigt eine deutliche Einteilung in Lepidopleurida und Chitonida. Innerhalb der Chitonida trennen sich Chitonina und Acanthochitonina auf.

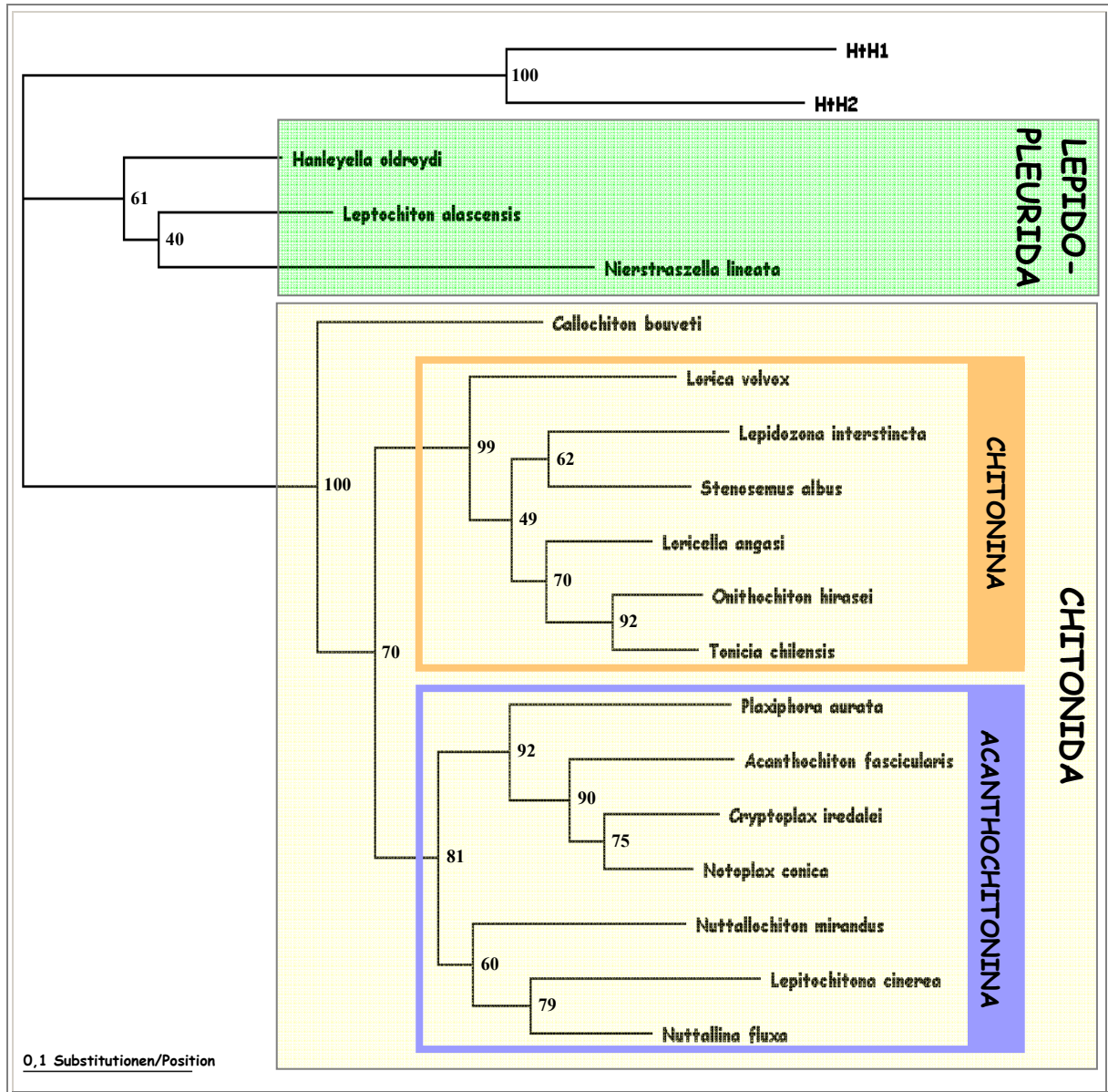


Abb. 34: Phylogenie der Polyplacophoren

Der Stammbaum resultiert aus einer Maximum-Likelihood-Analyse (1000 Replikate), die auf dem WAG-Substitutionsmodell basiert. Die zwei Hämocyanin-Isoformen von *Haliotis tuberculata* (HtH1 und HtH2) wurden als Außengruppe gewählt. Die Polyplacophoren werden in die beiden Ordnungen der Lepidopleurida (grün) und Chitonida (gelb) unterteilt. *Callochiton bouveti* wird eindeutig als Innengruppe der Chitonida eingeordnet. Innerhalb der Chitonida zeigt sich eine Auftrennung in Chitonina (orange) und Acanthochitonina (blau).

D DISKUSSION

1. Entwicklungsspezifische Expression der Hämocyanine von *Haliotis asinina*

Obwohl bereits zahlreiche physiologische Untersuchungen an Hämocyanin durchgeführt wurden (van Holde & Miller, 1995; Brown & Terwilliger, 1998; Decker & Rimke, 1998; Nagai & Kawabata, 2000; Decker et al., 2001; van Holde et al., 2001; Behrens et al., 2002), ist bisher immer noch unklar, welchem Zweck die Expression unterschiedlicher Isoformen dient und durch welche Kontrollmechanismen diese differentielle Expression gesteuert wird. Expressionsanalysen am Hämocyanin von *Haliotis asinina* sollten Erkenntnisse darüber liefern.

Die Whole mount *in situ*-Hybridisierungen (WMISH) zeigten, dass die Transkription der Hämocyanin-Gene in *Haliotis asinina* schon 9 Stunden nach der Befruchtung einsetzt und von diesem Zeitpunkt an in allen Stadien der Larvalentwicklung nachweisbar ist (Abb. 21). Während dieser Entwicklungsphase sind die Expressionsmuster der beiden Isoformen weitgehend überlappend. Ob die mRNAs, die für die zwei Isoformen kodieren, in den gleichen Zelltypen exprimiert werden, und ob diese Zelltypen aus denselben Vorläuferzellen hervorgehen, lässt sich anhand der WMISH nicht nachvollziehen. Es wurde bisher auch noch nicht geklärt, ob die respiratorischen Proteine in diesen frühen Entwicklungsstadien tatsächlich schon gebildet werden. Falls die Transkription der Hämocyanin-Gene nicht mit einer Translation einhergehen sollte, so könnten die Expressionsmuster der WMISH damit erklärt werden, dass die mRNA in hämocyaninexprimierenden Zellen „vorsorglich“ gebildet und akkumuliert wird. Dass es sich hierbei um maternale RNA handelt, kann ausgeschlossen werden, da weder im Ovar noch in den Testis Hämocyanin-mRNA vorhanden ist. Eine Ansammlung von mRNA könnte dazu dienen, die Hämocyanine schnell und in einem erhöhten Maße zu exprimieren, sobald es erforderlich ist. Solch ein „antizipiertes“ Entwicklungsprogramm wurde auch schon für andere Zelltypen bei *Haliotis* beschrieben (Degnan et al., 1995; Jackson et al., 2002). In diesen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass in larvalen Zellen, die nach der Metamorphose im adulten Tier den Darm ausbilden, Chymotrypsin-Transkripte vorhanden sind, die sich im weiteren Verlauf der Larvalentwicklung in diesen noch nicht funktionellen Zellen akkumulieren. Nach Induktion durch ein spezifisches, morphogenetisches Signal resultiert aus der Anhäufung der Chymotrypsin-mRNA eine gesteigerte Expression und eine rapide Migration der Zellen zum jeweiligen Bestimmungsort des zukünftigen Darmgewebes (Degnan et al., 1995).

Geht man jedoch davon aus, dass mit der frühen Transkription der Hämocyanin-Gene auch deren Expression einsetzt, so stellt sich die Frage, welche Funktionen die Hämocyanine während der Entwicklung der Larven ausüben. Da die sich entwickelnden Larven einen Durchmesser von etwa 140 μm (Praeveliger) bis 300 μm (Veliger) haben, könnte die Sauerstoffversorgung problemlos über Diffusion stattfinden (Streit et al., 2005), womit Sauerstofftransportproteine in diesen Entwicklungsstadien noch nicht notwendig wären. In dieser Entwicklungsphase könnten die Hämocyanine alternativ als Aminosäurespeicher fungieren (Markl et al., 1991). Ein solches Speicherprotein könnte von Vorteil sein, da die Praeveliger der Haliotidae als planktotrophe Larven die Eihüllen verlassen und somit nicht auf Nährstoffquellen wie Eiklar oder Nähreier zurückgreifen können. Die pelagischen Larven treiben abhängig von der Meeresströmung im Wasser, wodurch sie auch in nährstoffärmere Regionen abdriften können. In solchen Situationen könnten Hämocyanine als Aminosäurereservoir überlebenswichtig sein. Der Verlust der schützenden Eihülle führt des Weiteren dazu, dass die Larven unmittelbar den Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Es wäre möglich, dass Hämocyanine beispielsweise bei mikrobiellem Befall oder bei Verwundung der Larve an einer Immunantwort beteiligt sind. Dass Hämocyanine solche Funktionen übernehmen können, belegen Untersuchungen an Cheliceraten-Hämocyaninen, die unter bestimmten Bedingungen Phenoloxidaseaktivitäten zeigten. Daher wird spekuliert, dass das Hämocyanin dieser Cheliceraten die dort fehlende Phenoloxidase ersetzt und an der Immunantwort beteiligt ist (Decker & Rimke, 1998; Salvato et al., 1998; Nagai & Kawabata, 2000; Decker & Tuzcek, 2000; Decker et al., 2001). Für Phenoloxidasen von Arthropoden konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie an der humoralen Immunantwort und der Wundheilung beteiligt sind (Åspan & Söderhall, 1991; Söderhall & Cerenius, 1998).

Trotz der Annahme, dass die Larven aufgrund ihrer geringen Größe nicht auf ein Sauerstofftransportprotein angewiesen sind, könnten Hämocyanine in spezifischen larvalen Geweben für eine verbesserte Sauerstoffversorgung notwendig sein. Durch die WMISH konnte nachgewiesen werden, dass Hämocyanin-mRNA ab dem 24-Stundenstadium in den Statocysten transkribiert wird. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Statocysten bereits während der pelagischen Entwicklungsphase ihre Funktion ausüben und für die notwendige Orientierung im Wasser sorgen. Die Statocysten sind mit einer Vielzahl von Sinneszellen ausgestattet, deren Aktivitäten einen erhöhten Sauerstoffverbrauch zur Folge haben können. Es wäre denkbar, dass die Menge an diffundierendem Sauerstoff nicht genügt, um die Statocysten ausreichend zu versorgen. Daher könnte lokal Hämocyanin exprimiert werden, um deren Sauerstoffversorgung zu gewährleisten.

In späteren Stadien, wenn der Fuß zunehmend dominiert, und sich der Veliger zum Pediveliger entwickelt (Abb. 21, ab dem 72-Stundenstadium), sind die HaH1- und HaH2-mRNAs vor allem in der Visceralmasse und im Fuß nachweisbar. Die Larven gehen nach 5 bis 6 Tagen vom Schwimmen zum Kriechen auf dem Substrat über (Abb. 21, 130-Stundenstadium). Der muskulöse Fuß könnte aufgrund hoher Aktivitäten einen gesteigerten Sauerstoffbedarf haben, der mittels Hämocyanin gedeckt wird.

In der Visceralmasse und im Fuß können auch noch nach der Metamorphose (in den juvenilen Tieren) die mRNAs beider Isoformen detektiert werden. Das Schicksal der hämocyaninexprimierenden Zellen scheint demnach schon sehr früh in der Entwicklung vorprogrammiert zu sein. Diese Beobachtungen korrelieren mit vorangegangenen Untersuchungen an *Haliotis rufescens*, die zeigten, dass die meisten adulten Gewebe und Organe schon vor der Metamorphose ihre finale Position einnehmen (Degnan & Morse, 1995; Degnan et al., 1997). Die Formation nicht-larvaler Strukturen vor der Metamorphose wurde als eine Art „Vorbereitung“ auf die benthische, kriechende Lebensphase interpretiert und könnte ein Beleg für die frühe Determination in der Entwicklung der Spiralia sein (Boyer, 1998).

Im juvenilen Stadium fallen in verschiedenen Geweben isoformspezifische Expressionsmuster auf. So ist beispielsweise in den Epipodialtentakeln und im Mundbereich ausschließlich eine HaH2-Expression feststellbar, wohingegen in den Kopftentakeln und Augensielen nur HaH1-mRNA detektiert werden kann. Auch im Eingeweidesack sind isoformspezifische Expressionsmuster erkennbar. Diese differentielle Expression lässt vermuten, dass Hämocyanin auch in den juvenilen Tieren neben dem Sauerstofftransport in der Hämolymphe noch weitere Aufgaben übernimmt. Hinweise auf spezifische Funktionen der jeweiligen Isoform lieferten bereits frühere Untersuchungen, die beispielsweise unterschiedliche Kooperativitäten und Sauerstoffbindungseigenschaften der Hämocyanin-Isoformen aufdeckten (z.B. van Holde et al., 2000; Zielinski et al., 2001; Behrens et al., 2002; Perbandt et al., 2003). Untersuchungen an *Megathura crenulata* zeigten, dass diese Tiere während der Hälterung die Hämocyanin-Isoform 1 (KLH1) abbauen und trotzdem vital bleiben (Markl et al., 1991). Setzt man sie jedoch einer definierten Diät aus, so bleiben beide Isoformen erhalten (Oakes et al., 2004). Möglicherweise spielt die Hämocyanin-Isoform 1 bei *M. crenulata* keine essentielle Rolle für die Sauerstoffversorgung der Tiere, sondern übt eine anderweitige Funktion aus. In der Literatur werden für Hämocyanine Aufgaben im Bereich der Sauerstoffspeicherung (Behrens et al., 2002), Aminosäurespeicherung (Markl et al., 1991) oder eine osmoregulatorische Funktion diskutiert (Brown & Terwilliger, 1998; van Holde et

al., 2001). Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an *H. asinina* lieferten Hinweise auf eine unterschiedliche Funktionalität der beiden Isoformen. In der Hämolymphe adulter *H. asinina* wurde ein Konzentrationsverhältnis der beiden Isoformen von etwa 1:2 (HaH1:HaH2) ermittelt, wohingegen gerade das umgekehrte Verhältnis an mRNA nachgewiesen wurde. Ähnliche Beobachtungen konnten für die Hämocyanine von *H. tuberculata* und *M. crenulata* gemacht werden (Söhngen et al., 1997; Lieb et al., 1999; nicht publizierte Daten). Dass das Konzentrationsverhältnis von HaH1 zu HaH2 in der Hämolymphe nicht mit den ermittelten Transkriptionsraten der beiden Isoformen korreliert, könnte auf eine spezifische Regulation während der Translation zurückzuführen sein (siehe D 2.). Es wäre aber auch denkbar, dass HaH1 entsprechend der transkribierten mRNA translatiert wird und im Anschluss teilweise intrazellulär akkumuliert, um in der Zelle beispielsweise als O₂-Speicher zu fungieren (Beuerlein et al., 1998; Behrens et al., 2002). Möglicherweise ist HaH1 aber auch weniger stabil als HaH2 und wird daher schneller abgebaut. Dadurch wäre letztlich weniger HaH1 in der Hämolymphe nachweisbar als man es aufgrund der Transkriptionsrate erwarten würde.

Die WMISH ergaben, dass die mRNAs von HaH1 und HaH2 in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium differentiell exprimiert werden, und dass in verschiedenen Geweben der juvenilen Tiere isoformspezifische Expressionsmuster auftreten. Diese Ergebnisse und die Fülle an physiologischen Unterschieden (z.B. in Bezug auf Kooperativität, O₂-Affinität und Bohreffekt), die zwischen Hämocyanin-Isoformen aufgedeckt wurden, liefern Hinweise auf alternative Funktionen der Hämocyanine. Welche dies im Speziellen sind, müssen weitere Versuche zeigen (z.B. Knock out- und RNAi-Analysen). Demnach stellen HaH1 und HaH2 sehr wahrscheinlich keine redundant exprimierten Proteine dar, sondern erfüllen hochspezialisierte Aufgaben.

2. Gen- und Sequenzanalysen

In der vorliegenden Arbeit sollten die Hämocyanin-Gene von *M. crenulata* und *H. tuberculata* dahingehend analysiert werden, ob regulatorische Elemente in den Sequenzen vorliegen, die eine differentielle Expression bedingen könnten. Da für die Expressionsregulation neben der mRNA-Stabilität und deren Lokalisation im Besonderen auch die Transkriptionsrate und Translationseffizienz entscheidend sind (Wickens et al., 1997, Kloc et al., 2002), wurden die Promotorbereiche, 5'UTR und Signalsequenzen analysiert. Promotorbereiche, die mit spezifischen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren interagieren, spielen auf Ebene der Transkriptionskontrolle eine wichtige Rolle. Für eine translationelle Regulation hingegen sind zum Großteil die Abschnitte der mRNA von Bedeutung, die nicht für die Aminosäuren eines Proteins kodieren und daher als untranslatierte Regionen (UTR) bezeichnet werden (Pontrelli et al., 2004). Spezifische RNA-bindende Proteine binden an *cis*-Elemente in diesen UTRs und beeinflussen dadurch überwiegend die Translationseffizienz und Stabilität der mRNA. Die kodierenden Sequenzen wurden in Hinblick auf ein präferiertes „Codon-Usage“ untersucht, da selten verwendete Codons die Translation inhibieren und häufig genutzte Codons die Translation beschleunigen können (Neafsey & Galagan, 2007).

2.1 Analyse der für HtH und KLH kodierenden Sequenzen

Eine Ursache für die unterschiedlichen Expressionsraten der Hämocyanin-Isoformen von *H. tuberculata* und *M. crenulata* könnte eine ungleiche Verwendung bestimmter Codons sein. Deshalb wurden die cDNAs der Isoformen von HtH und KLH statistisch auf besonders signifikante Merkmale der „Codon-Usage“ und der Aminosäurezusammensetzung untersucht. Die Charakterisierung der „Codon-Usage“ der für KLH1, KLH2, HtH1 und HtH2 kodierenden Sequenzen zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf präferierte Codons (Tab. 9). Der Vergleich der relativen Aminosäurezusammensetzung dieser vier Hämocyanin-Isoformen zeigte auch keine auffälligen Abweichungen zwischen den Isoformen der beiden Arten. Demnach ist eine spezielle „Codon-Usage“ und Aminosäurezusammensetzung als Ursache für die differentielle Expression auszuschließen. Die ungleiche Verteilung der Hämocyanine von *H. tuberculata* und *M. crenulata* in der Hämolymphe muss demnach durch die Transkription, die mRNA-Prozessierung oder die posttranslationelle Modifikation bedingt sein.

	CODON	KLH1	KLH2	HTH1	HTH2	
Phenylalanin	UUU	41	51	43	40	
	UUC	59	49	57	60	
Serin	UCU	27,8	29,5	19,8	22,2	
	UCC	15,1	12,8	19,4	21,6	
	UCA	21,7	21,6	14,4	17,5	
	UCG	8	4,8	13,8	6	
	AGU	12,7	15	17,8	15,2	
	AGC	14,7	16,3	14,8	17,5	
Tyrosin	UAU	41,5	44,5	43,5	39,5	
	UAC	58,5	55,5	56,5	60,5	
	UGA	0	0	0	0	
Cystein	UGU	59,5	56,5	66,5	62	
	UGC	40,5	43,5	33,5	38	
Tryptophan	UGG	100	100	100	100	
Leucin	UUA	7,1	5,8	6	2,3	
	UUG	19,1	14,7	15,8	11,9	
	CUU	27,3	29,2	26,6	24	
	CUC	15,7	22,5	16,8	23,6	
	CUA	4,5	7,3	7,6	10,9	
	CUG	26,3	20,5	27,2	27,3	
	Prolin	CCU	32,2	35,7	33,1	28,5
		CCC	19,3	14	20	29
		CCA	39	45,5	38,1	33,5
		CCG	9,5	4,8	8,8	9
Histidin	CAU	59	50,5	52,5	46,5	
	CAC	41	49,5	47,5	53,5	
Glutamin	CAA	46	52,5	44	31,5	
	CAG	54	47,5	56	68,5	
Arginin	CGU	22	14,5	11	18,8	
	CGC	6,2	5,7	14,6	10	
	CGA	18,5	17,1	8,6	8,8	
	CGG	8,2	3,8	8,6	2,7	
	AGA	36,3	41,8	35	37,2	
	AGG	17,8	17,1	22,2	22,5	
	Isoleucin	AUU	39,3	39,6	36,5	28
		AUC	35,3	37,4	39,5	59,6
		AUA	25,4	23	24	12,4
	Methionin	AUG	100	100	100	100
Threonin	ACU	31	28,5	31,7	23,2	
	ACC	23,1	24,2	25,5	36,6	
	ACA	32,7	38,5	30,7	32,2	
	ACG	13,2	8,8	12,1	8	
	Asparagin	AAU	55,5	52	45,5	40
AAC		44,5	48	54,5	60	
Lysin	AAA	58	55,5	49,5	41	
	AAG	42	44,5	50,5	59	
Valin	GUU	33,7	42,2	29,5	34,8	
	GUC	29,3	23	32,1	34,2	
	GUA	15,7	16,3	14,1	13,2	
	GUG	21,3	18,5	24,3	17,8	
Alanin	GCU	35,5	44	37	38,6	
	GCC	30,2	19	21	29,6	
	GCA	26	31	30,7	23,3	
	GCG	8,3	6	11,3	8,5	
	Asparagin	GAU	52,5	55,5	47	44
GAC		47,5	44,5	53	56	
Glutamin	GAA	60	57	58,5	46,5	
	GAG	40	43	41,5	53,5	
Glycin	GGU	32,4	28	21,5	25,5	
	GGC	21,2	16,5	25	23	
	GGA	37,7	45	38	40	
	GGG	8,7	10,5	15,5	11,5	

Tab. 9: „Codon-Usage“-Analyse der KLH- und HtH-DNA

Die Werte geben in Prozent an, wie häufig die jeweilige Aminosäure durch das entsprechende Codon kodiert wird. Der Vergleich zwischen diesen vier Hämocyaninen zeigt keine signifikanten Unterschiede.

2.2 Identifizierung des Transkriptionsstartpunkts von KLH2 und HtH2

Bei Eukaryoten erfolgt die Genregulation in erster Linie durch die Steuerung der Transkriptionsinitiation (Hochheimer & Tjian, 2003). Daher sollten für die KLH- und HtH-Gene zunächst der jeweilige Transkriptionsstartpunkt (Transcription Start Site = TSS) identifiziert und die Sequenzen der Initiatorregion analysiert werden.

Die cDNA-Sequenz der 5'UTR von KLH2 konnte mit Hilfe des *GeneRacers* gewonnen werden. Diese Methode garantiert, dass die auf diese Weise amplifizierte Sequenz die vollständige 5'UTR und somit auch den Transkriptionsstartpunkt beinhaltet. Auch für HtH2 ist es gelungen, die TSS zu identifizieren. Jedoch wurde in diesem Fall eine *GenomeWalker*TM PCR durchgeführt. Die daraus resultierende genomische Sequenz reicht vom Promotor bis in die für das Signalpeptid 1 kodierende Sequenz. Um innerhalb dieser Sequenz die TSS bestimmen zu können, wurde ein Alignment mit der Sequenz von KLH2 durchgeführt, deren TSS bekannt war (siehe Abb. 35 und Abb. 38). Das Alignment zeigt, dass die 5'UTR-Sequenzen der beiden Hämocyanin-Gene zu 84% identisch sind. Die KLH2-5'UTR ist mit einer Länge von 23 Nukleotiden zwei Nukleotide kürzer und unterscheidet sich nur in drei weiteren Nukleotiden von der entsprechenden HtH2-Sequenz. Da bei beiden Hämocyanin-Genen die Initiatorregion, welche die Basen direkt vor und hinter dem Transkriptionsstart umfasst, identisch ist, konnte auch für HtH2 die TSS identifiziert werden. Die Initiatorregion kann dieselbe Funktion wie die TATA-Box übernehmen (siehe D 2.3), indem sie mit einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors TBP interagiert und dadurch die korrekte Positionierung des Initiationskomplexes am Transkriptionsstart gewährleistet (Kaufmann & Smale, 1994; Lynch & Hong, 1996). Die beiden Initiatorregionen weisen Übereinstimmungen zu dem semikonservierten Sequenzmotiv Py-Py-A₊₁-N-(T/A)-Py-Py auf (Lo & Smale 1996), wobei Py für ein Pyrimidin und N für ein beliebiges Nukleotid steht. Beide Initiatoren besitzen an der Position +1 ein Adenin, das von Pyrimidinen an den Positionen -1, -2 und +5 flankiert wird. Das Pyrimidin an Position -1 ist wie bei den meisten natürlich vorkommenden Initiatoren ein Cytosin (Kozak, 1999; siehe Abb. 35 und Abb. 38). Die Positionen +3 und +4 stimmen jedoch nicht mit der Konsensussequenz überein.

Von der Isoform 1 des HtH und KLH liegen nur partielle Sequenzinformationen der Initiatorelemente vor, da es nicht gelang, deren 5'UTRs vollständig zu sequenzieren. Es war daher nicht möglich, die Initiatorelemente der Isoformen 1 und 2 miteinander zu vergleichen. Somit konnte auch nicht geklärt werden, ob Sequenzunterschiede in den Initiatorelementen der beiden Isoformen bestehen, welche die isoformspezifische Expression von KLH1 und KLH2 bzw. HtH1 und HtH2 beeinflussen könnten.

Der Sequenzvergleich der bisher analysierten Leadersequenzen von HtH1 und KLH1 lieferte mit einer Identität von nur 56% einen geringen Wert im Vergleich zur 84%igen Identität, die zwischen den 5'UTR-Sequenzen der Isoform 2 vorliegt (Abb. 35). Bezieht man noch die nicht vollständig analysierten Hämocyanin-Leadersequenzen von *Aplysia californica* (AcH, Gastropoden), *Octopus dofleini* (OdH, Cephalopoden), *Nautilus pompilius* (NpH, Cephalopoden) und *Nucula nucleus* (NnH1 und NnH2, Bivalvia) in den Vergleich mit ein, so stellt man fest, dass diese bezüglich ihrer Längen, die zwischen 20 bp und 103 bp variieren, sehr heterogen sind. Dadurch bedingt sind die Identitäten, die aus den absoluten Alignments resultieren, mit weniger als 30% sehr niedrig. Führt man jedoch relative Alignments durch, so weisen auch diese 5'UTR-Sequenzen in verschiedenen Bereichen hohe Identitäten untereinander auf. So findet man beispielsweise zwischen den Sequenzen von AcH und NnH1 in einem Sequenzabschnitt, der sich über 20 bp erstreckt, eine 100%ige Identität (Abb. 35). Die KLH1-Sequenz stimmt zu 60% mit der *Nautilus pompilius*-Sequenz überein, womit zwischen diesen beiden Sequenzen überraschenderweise eine höhere Identität vorliegt als zwischen KLH1 und HtH1. Diese Homologie (Abb. 35) könnte ein Indiz dafür sein, dass es sich bei den 5'UTR-Sequenzen um ursprüngliche, konservierte Leadersequenzen handelt. Diese Annahme wird dadurch untermauert, dass die Leadersequenz von *Nautilus pompilius*, der sich als Vertreter der Cephalopoden vor mehr als 500 Millionen Jahren von den Gastropoden und Bivalvia getrennt hat (Benton, 1993; Bergmann, 2004), weitere auffällige Sequenzidentitäten zu *Aplysia californica* und *Nucula nucleus* aufzuweisen hat. Damit deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass nicht nur kodierende Sequenzen, sondern auch die 5'UTR-Sequenzen unter einem evolutionären Erhaltungsdruck stehen und womöglich Einfluss auf die Regulation der Hämocyanin-Synthese haben (van der Velden & Thomas, 1999).

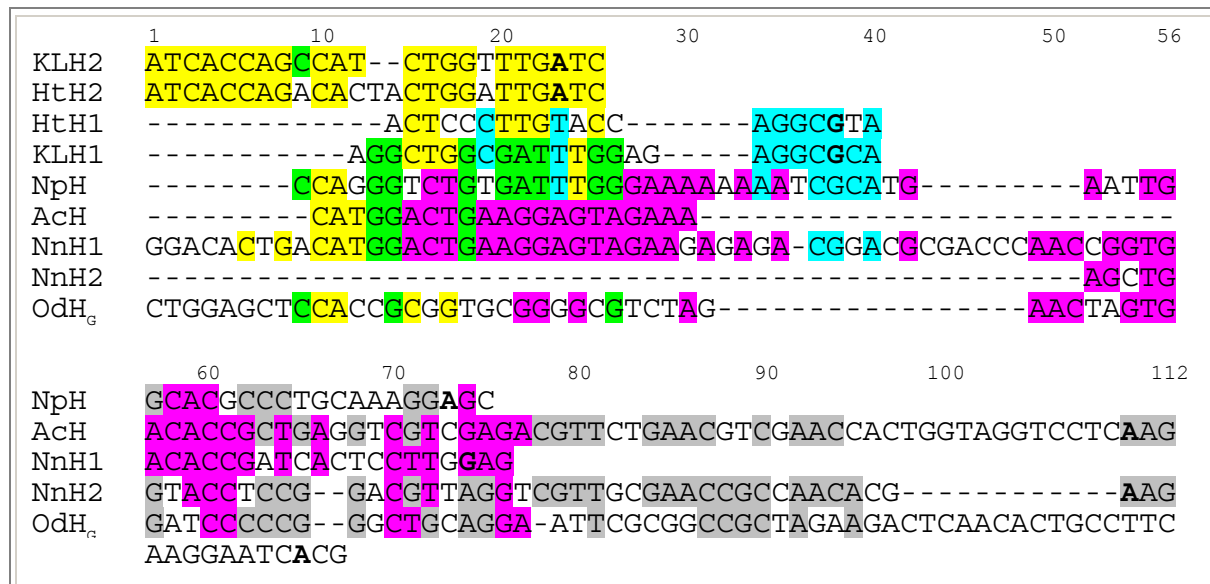


Abb. 35: Alignment der Leadersequenzen

Die Längen der aufgeführten Leadersequenzen differieren. Übereinstimmungen in den Sequenzen sind farbig hervorgehoben. Die auffälligsten Sequenzhomologien bestehen zwischen KLH2 und HtH2. Die Position -3 (relativ zum Translationsstart, fett markiert) ist eine hochkonservierte Stelle und wird sehr häufig durch ein Adenin oder Guanin besetzt (Kozak, 1987).

2.3 Promotoren der Gene von KLH2 und HtH2 beinhalten eine TATA-Box

Nahezu alle proteinkodierenden Gene werden von der RNA-Polymerase II transkribiert. Diese ist, im Gegensatz zur prokaryotischen RNA-Polymerase, nicht in der Lage, die TSS selbstständig zu erkennen und die Transkription zu initiieren. Daher besitzt der Promotor Erkennungssequenzen, an die so genannte allgemeine Transkriptionsfaktoren (GTF = general transcription factor) binden, welche die RNA-Polymerase II präzise am Transkriptionsstartpunkt positionieren (Roeder, 1996; Hochheimer & Tjian, 2003). Innerhalb des Promotors befinden sich des Weiteren spezifische Sequenzmotive (*cis*-Elemente), an die regulatorische Transkriptionsfaktoren (RTF) binden. Diese regulieren die Transkriptionsrate über direkte oder indirekte Wechselwirkungen mit den GTFs (Guzowski et al., 2001).

Da bisher noch keine Untersuchungen an Promotoren von Hämocyanin-Genen durchgeführt wurden, ist nicht bekannt, ob es hämocyaninspezifische regulatorische Transkriptionsfaktoren gibt. Mit den Programmen „TF-Search“ und „TESS“ wurden daher die 906 bp lange Promotorsequenz von KLH2 und die 181 bp umfassende Region des HtH2-Promotors auf Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. Diese Analyseprogramme beziehen sich auf Datenbanken (TRANSFAC, IMD, CBIL-GibbsMatin), in welchen unter anderem gewichtete Positionsmatrizen für Bindestellen von Transkriptionsfaktoren zusammengefasst sind. Da Hämocyanine kupferbindende Proteine sind, und Kupfer Einfluss auf die Expression

spezifischer Gene ausüben kann (Koch & Thiele, 1996), wurden die Promotorsequenzen auch hinsichtlich potentieller „Metal responsive Elements“ (MRE) untersucht.

In den beiden untersuchten Hämocyanin-Gensequenzen konnte das Sequenzmotiv der TATA-Box identifiziert werden. Es liegt im KLH2-Gen an Position -32 und im HtH2-Gen an Position -31. Viele differentiell regulierte eukaryotische Gene besitzen 20-40 bp upstream des Transkriptionsstartpunktes dieses konservierte Promotorelement (Lynch et al., 2005). Diesem Sequenzmotiv kommt besondere Bedeutung zu, weil es direkt mit den Transkriptionsfaktoren des „TATA-Binding-Protein“ (TBP) interagiert und die Transkription durch die RNA-Polymerase II initiiert (Prestridge, 1995). Die häufig in eukaryotischen Promotoren vorhandene CAAT-Box (Werner, 1999), welche eine Erkennungsstelle für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren darstellt (Johnson & McKnight, 1989), konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die bisher analysierten KLH2- bzw. HtH2-Promotorsequenzen besitzen auch keine Bindungsstellen für „Metal responsive Elements“. Die Promotor-Analysen lieferten jedoch eine sehr große Anzahl weiterer potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Es konnten aber in den beiden Hämocyanin-Promotorsequenzen mit Ausnahme der TATA-Box keine gemeinsamen Motive identifiziert werden. Somit lieferte diese *in silico* Analyse der Isoform 2-Promotorsequenzen keine Hinweise auf die Existenz hämocyaninspezifischer Transkriptionsfaktoren. Da weder vom KLH noch vom HtH Promotorsequenzen der Isoform 1 vorlagen, konnten keine vergleichenden Analysen zwischen den Promotorsequenzen der Hämocyanin-Isoformen 1 und 2 einer Art gemacht werden. Daher können auch keine Aussagen über den möglichen Einfluss dieser Region auf die differentielle Expression der beiden Isoformen getroffen werden.

<p>KLH2 5' -TATAAAGTATCGCGCTAGTCTTGCCAGCATCA₁TCACCAGCCATCTGGTTTGATC-3'</p> <p>HtH2 5' -TATAAAAGACTGTATCTCA_GGGGTCAGCGTCA₁TCACCAGACACTACTGGATTGATC-3'</p>
--

Abb. 36: Alignment einer Teilsequenz der Promotoren und 5'UTRs der KLH2- und HtH2-Gene

Der Sequenzvergleich zeigt am 3'-Ende des Promotors (schwarze Schrift) einen kurzen übereinstimmenden Bereich. Die Sequenzen der 5'UTRs beider Hämocyanin-Gene (rote Schrift) sind bis auf vier Positionen identisch. Die TATA-Box ist hervorgehoben (blau), der Transkriptionsstartpunkt ist durch A₊₁ (fett) markiert. Ein Alignment der Promotorregion vor der TATA-Box zeigte keine signifikanten Übereinstimmungen.

2.4 Vergleich der bisher bekannten Signalsequenzen von *Haliotis tuberculata*, *Megathura crenulata*, *Nautilus pompilius*, *Aplysia californica*, *Nucula nucleus* und *Octopus dofleini*

In den bisher analysierten Signalsequenzen der Hämocyanin-Gene von *Haliotis tuberculata*, *Megathura crenulata*, *Nautilus pompilius*, *Aplysia californica*, *Nucula nucleus* und *Octopus dofleini* konnte jeweils ein potentiell Startcodon (ATG) identifiziert werden. Durch Sequenzanalysen des Bereichs in unmittelbarer Nähe des Startcodons konnte in diesen Mollusken-Leadersequenzen auch das hoch konservierte Purin (Adenin oder Guanin) an Position -3 (Kozak, 1987, 1997) nachgewiesen werden.

Bis auf die Sequenzen von *Nucula nucleus* sind alle in diese Analyse einbezogenen Sequenzdaten auch auf genomischer Ebene bestätigt. Ein Vergleich der Signalsequenzen der Gene mit den entsprechenden cDNAs zeigte, dass die für die Signalpeptide kodierenden Sequenzen in allen Fällen durch ein Intron in Phase 0 getrennt werden. Die auf diese Weise getrennten Signalsequenzen werden demnach als Signalpeptid 1 und Signalpeptid 2 bezeichnet. Um die *Nucula nucleus*-Sequenzen besser in einen Gesamtvergleich einbeziehen zu können, wurden deren Signalsequenzen mit Hilfe eines Sequenzalignments mit den übrigen Hämocyanin-Sequenzen so geteilt, dass sie den Signalsequenzen 1 bzw. den Signalsequenzen 2 zugeordnet werden konnten (Abb. 38). Um diese Einteilung zu verifizieren, müssten allerdings die entsprechenden Genbereiche sequenziert werden.

Die Signalpeptide der hier analysierten Hämocyanin-Sequenzen variieren in ihrer Länge und bestehen aus 16 bis 21 Aminosäuren. Diese beinhalten hauptsächlich hydrophobe Reste (Abb. 37), was charakteristisch für extrazelluläre Proteine ist (Nilsson et al., 1994; Klein et al., 1996).

KLH1	MLSVRLLIIVLALANA
HtH1	MWLVQFLVALVAGAGA
KLH2	MWTILALLTATLLFEGAFSV
HtH2	MWTIVALLLTPLLCRGVQSSV
NnH1	MRLPLIFLALGIQVCIVHP
NnH2	MRLPFIVLLLALQAAA
AcH	MVGYLGGQALMALLLLALSNA
NpH	MATHWHSLLLFSLQLLVFTYA
OdH_G	MKILCLFAFVFAFWLSGQSAE

Abb. 37: Vergleich der Hämocyanin-Signalpeptide
Die Signalsequenzen kodieren größtenteils (zu 57% bis 82%) für hydrophoben Aminosäuren (blau hinterlegt).

Im Alignment der Signalsequenzen (Abb. 38) sind über große Bereiche konservierte Sequenzmuster erkennbar. Besonders hohe Übereinstimmung zeigen die Signalsequenzen 1 von KLH2 und HtH2, die zu 60% identisch sind. Ähnliches wäre für die Signalsequenzen der Isoform 1 dieser beiden Hämocyanin-Gene zu erwarten gewesen. Jedoch zeigte sich, wie auch schon im Alignment der 5'UTR, dass die Sequenzen der Isoform 1 beider Vetigastropoden nicht so stark konserviert sind wie die entsprechenden Sequenzen der Isoform 2.

Die Übereinstimmungen in den Sequenzabschnitten, die für das Signalpeptid 2 kodieren, fallen deutlich geringer aus. Hierbei sind selbst zwischen Sequenzen von KLH2 und HtH2 nur geringe Identitäten feststellbar. Es fällt jedoch auf, dass die kompletten Signalsequenzen der Isoformen 1 von HtH und KLH um etwa 20% kürzer sind, als die entsprechenden Sequenzen der Isoform 2. Die durchgeführten Sequenzanalysen lieferten keine Hinweise darauf, dass die Ursache für die unterschiedlich starke Expression der beiden Isoformen bei *Haliotis* und *Megathura* bei den Leader- bzw. Signalsequenzen liegt.

Signalsequenz 1		
KLH2	ATGTGGACCATCTTGGCTCTCCTCACGGCGACCCTCTTGTTTGAG	45 bp
HtH2	ATGTGGACGATCGTGGCGTTGTTATTGACCCCCCTTCTCTGTAGG	45 bp
KLH1	ATGCTGTTCGGTCAGGTTGCTTATAGT-----CGTGTGTG	33 bp
HtH1	ATGTGGCTTGTTTTCAGTTTCTACTCGTCGC-----CCTTGTG	36 bp
OdHG	ATGAAAAATTCTTTGTCTTTTGTGCCTTCGT-----CTTCGCC	36 bp
NnH1	ATGAGGCTTCCATTAATATTTCTGGCCTTGGG-----CATTGAG	39 bp
NnH2	ATGCGTCTGCCTTTTCATAGTGTCTGTGCTAGC-----CTTGCAG	39 bp
NpH	ATGGCGACTCACTGGCACAGCTTGTGCTGTT---CTCTCTGCAG	42 bp
AcH	ATGGTGGGTTTACTGGGTCAAGCGCTGATGGC---TTTGCTTCTG	42 bp
Signalsequenz 2		
HtH2	-----GGGTTTTCAGTCTTCAGTC-----	18 bp
KLH2	-----GGAGCCTTCTCGGTA-----	15 bp
HtH1	-----GCGGGGGCTGGAGCA-----	15 bp
KLH1	-----GCTTTGGCCAATGCA-----	15 bp
NnH1	-----GTCTGTATTGTTTCATCCT-----	18 bp
NnH2	-----GCTGCTGCT-----	9 bp
AcH	-----CTGGCTTTAAGCAACGCT-----	18 bp
NpH	--CTCCTTGTCTTCACTTATGCT-----	21 bp
OdHG	TTCTGGTTATCCGGGCAAA GCGCAGAA	27 bp

Abb. 38: Alignment der Signalsequenzen

Besonders in den für das Signalpeptid 1 kodierenden Abschnitten sind Übereinstimmungen zu erkennen. Alle Signalsequenzen beginnen mit dem für Methionin kodierenden Codon „ATG“. Die Signalsequenzen von HtH2 und KLH2 zeigen die größten Identitäten zueinander (48%).

Da auch in der 3'UTR regulatorische Bereiche lokalisiert sein können, welche die Translationsrate beeinflussen (Mignone et al., 2002; Mazumder et al., 2003), wurden Sequenzanalysen der 3'UTR aller bisher sequenzierten Mollusken-Hämocyanin-Gene durchgeführt. Es konnten jedoch keine regulatorischen Sequenzmotive identifiziert werden.

2.5 Chromosomenpräparationen an *Megathura crenulata* bestätigen KLH3

Die karyologischen Untersuchungen meiotischer Präparate aus verschiedenen Versuchstieren ergaben, dass der Chromosomensatz von *Megathura crenulata* sowohl aus $n = 16$ als auch $n = 17$ Chromosomen bestehen kann und somit nicht einheitlich ist (Abb. 26). Dies deutet auf einen interindividuellen Polymorphismus hin, der bereits in früheren Studien für *M. crenulata* beschrieben wurde (Diupotex-Chong et al., 2003). Die Chromosomen wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt, da diese eine hohe Sensitivität aufweisen und die Möglichkeit bieten, unterschiedliche Basenpaarzusammensetzungen kenntlich zu machen (Joachimiak et al., 1997). Weder bei der Färbung mit DAPI, die besonders Adenin und Thymin anfärbt, noch bei der Behandlung mit CMA₃, welches spezifisch an Guanin und Cytosin bindet, traten spezifische Bänderungen oder Fluoreszenzmuster auf. Diese homogene Färbung deutet auf eine ausgeglichene Basenpaarzusammensetzung hin.

Eine Färbung mit CMA₃ kann auch dienlich sein, um Chromosomen zu identifizieren, die „Nucleolus Organisator Regionen“ (NOR) tragen, da NORs häufig GC-reiche Regionen aufweisen. Auf den NORs befinden sich die Gene der 5,8S-, 18S- und 28S-rRNA, die zur Herstellung der Ribosomen essentiell sind. Da die CMA₃-Fluoreszenzmuster der Chromosomen von *M. crenulata*, wie bereits erwähnt, homogen sind, scheinen deren NORs keine GC-reichen DNA-Abschnitte zu enthalten. Diese Ergebnisse stehen im Konsens zu früheren Chromosomenanalysen an Pulmonaten (*Cantareus aspersusi* und *C. mazzullii*), die ergaben, dass deren NORs auch keine GC-reichen Regionen besitzen (Vitturi et al., 2000a, 2002, 2005).

Zur Lokalisation der Hämocyanin-Gene auf den Chromosomen wurden Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen (FISH) mit isoformspezifischen Sonden durchgeführt. Zu Beginn der Experimente gingen wir davon aus, dass *M. crenulata* zwei Hämocyanin-Isoformen besitzt. Daher wurden die FISH mit Isoform 1- und Isoform 2-spezifischen Sonden durchgeführt. Die beiden Hämocyanin-Sonden wurden zum einen separat eingesetzt, zum anderen zusammen in double-label-FISH verwendet.

Bei den Mitose-Chromosomen, die mit der Isoform 1-Sonde behandelt wurden, ist nur ein Signal zu erkennen, obwohl ein zweites auf dem homologen Chromosom zu erwarten gewesen wäre (Abb. 28 A). Möglicherweise handelt es sich bei dem detektierten Signal um ein Artefakt. In Wiederholungen dieses Versuchsansatzes gelang es nicht mehr, die Hämocyanin-Gene der Isoform 1 zu lokalisieren. Jedoch konnten die FISH auch nur in begrenztem Maße wiederholt werden, da wenig Gewebe für die Herstellung der Chromosomenpräparate zur Verfügung stand. Aufgrund dieser nicht eindeutig zu interpretierenden Ergebnisse konnte nicht geklärt werden, auf welchen Chromosomen die KLH1-Gene lokalisiert sind.

Der Hybridisierungsansatz, der mit der Isoform 2-Sonde durchgeführt wurde, zeigt vier Signale (Abb. 28 B). Demnach scheint neben dem Chromosomenpaar, auf dem das Hämocyanin-Gen der Isoform 2 lokalisiert ist, ein weiteres Chromosomenpaar eine Sequenzabfolge zu tragen, an der diese Sonde binden kann. Hierbei könnte es sich um das Gen einer weiteren KLH-Isoform handeln.

Kürzlich durchgeführte, molekularbiologische Untersuchungen ergaben, dass eine dritte KLH-Isoform existiert (Hanisch, 2006). Dabei konnte vom KLH3 der Bereich der vier aufeinander folgenden FUs-d, -e, -f und -g sequenziert werden. Diese KLH3-Sequenzen zeigen zum entsprechenden Sequenzabschnitt von KLH2 eine Identität von ~ 85%. Die Sonde, die für die FISH eingesetzt wurde, stammt aus der FU-h. Da jedoch die FU-h der Isoform 3 bisher noch nicht sequenziert wurde, können für diesen Genabschnitt keine Aussagen über die Sequenzidentitäten zwischen beiden Isoformen gemacht werden. Die hohen Identitäten der bisher analysierten Bereiche lassen jedoch erahnen, dass auch die Sequenzen der FU-h große Übereinstimmungen aufzuweisen haben und somit eine Kreuzhybridisierung der Isoform 2-Sonde am KLH3-Gen möglich ist. Im Rahmen meiner Arbeit war es nicht mehr möglich, eine Sequenzanalyse für die FU-h des KLH3 Gens durchzuführen, um die Sequenzidentitäten zu klären. Den vorliegenden Ergebnissen zufolge handelt es sich bei dem Locus des zweiten Signalpaares wahrscheinlich um die KLH3-Gene.

3. Analyse des Hämocyanin-Gens von *Aplysia californica*

3.1 Die Genstruktur von *Aplysia californica* liefert Hinweise auf ursprüngliche interne Introns

Im Rahmen meiner Arbeit konnten die Strukturen der Hämocyanin-Gene von *Haliothis tuberculata* vollständig aufgeklärt werden (siehe C 1.1.2.2). Ebenso ist das komplette KLH2-Gen von *Megathura crenulata* analysiert. Vom KLH1-Gen fehlen lediglich die Bereiche der 5'UTR sowie des Signalpeptids 1. Der Vergleich mit den bekannten Genstrukturen von KLH2, HtH1 und HtH2 lässt aber, unter Berücksichtigung der nahen Verwandtschaft dieser beiden Gastropoden, den Schluss zu, dass sich in diesem noch nicht analysierten Genbereich kein weiteres Intron befindet (Abb. 29). Die Linker-Introns, welche die einzelnen funktionellen Domänen voneinander trennen, sind in den vier Genen (HtH1, HtH2, KLH1 und KLH2) jeweils an gleicher Stelle und in gleicher Phase lokalisiert. In den Hämocyanin-Genen anderer Mollusken (*Octopus dofleini*, *Nautilus pompilius*, *Nucula nucleus*) liegen die Linker-Introns auch ausnahmslos in Phase 1 vor. Die Aufrechterhaltung von Phase und Position dieser Linker-Introns deutet darauf hin, dass es sich hierbei um sehr „ursprüngliche“ Introns handelt, was der „Intron-early“-Hypothese entspricht (Lieb et al., 2001).

Auch die Insertionsstellen der internen Introns der HtH- und KLH-Gene sind bezüglich ihrer Lage und Phase konserviert (Lieb et al., 2002). Bezieht man die internen Introns der bisher analysierten Hämocyanin-Gene von *Octopus dofleini*, *Nautilus pompilius* und *Nucula nucleus* in den Vergleich mit ein, so lassen sich jedoch keine Übereinstimmungen feststellen. Daher ging man bislang davon aus, dass es sich bei den internen Introns um „späte“ Introns handelt („Intron-late“-Hypothese), die frühestens nach der Trennung der Gastropoden und Cephalopoden inserierten (Lieb et al., 2001).

Im Zuge einer Genbankrecherche und anschließenden genomischen PCRs, die im Rahmen der Analyse zur Expressionskontrolle durchgeführt wurden, konnte ein Großteil des *Aplysia californica*-Hämocyanin-Gens ermittelt werden. Diese Daten wurden herangezogen, um weitere Erkenntnisse über die Evolution der Hämocyanin-Gene zu gewinnen.

Die AcH-Introns differieren in ihrer Größe und umfassen zwischen 234 bp und mehr als 1580 bp. In Bezug auf die Längen der 23 bisher vollständig sequenzierten AcH-Introns und aller bisher analysierten Hämocyanin-Introns sind keinerlei Korrelationen festzustellen. Da in Intronsequenzen regulatorische Blöcke lokalisiert sein können (Finkbeiner, 2001), wurde ein

Sequenzalignment aller Hämocyanin-Introns durchgeführt. Dieser Sequenzvergleich lieferte aber keine Hinweise auf konservierte regulatorische Bereiche.

Wie in allen bisher untersuchten Hämocyanin-Genen liegen auch im AcH-Gen die Linker-Introns in konservierter Lage und in Phase 1 vor. Somit bestätigen sie die Ergebnisse vorheriger Hämocyanin-Genanalysen (Lieb et al., 2001). Insgesamt kann man darauf schließen, dass die Linker-Introns bereits vor der Trennung der beiden Klassen der Cephalopoden und der Gastropoden entstanden sind. Der Kalkulation einer molekularen Uhr zufolge soll dies vor etwa 520 Millionen Jahren geschehen sein (Lieb et al., 2000). Es wird vermutet, dass das ursprüngliche Linker-Intron ein monomeres Vorläufer-Gen des späteren Hämocyanins flankierte und bei der Entstehung des Multi-Domänen-Proteins zusammen mit den Domänen (FUs) dupliziert wurde (Lieb et al., 2001; Bergmann, 2004). Aufgrund dieser Duplikationshypothese werden in folgenden Vergleichen die internen Introns, die in unterschiedlichen FUs einer Art an gleicher Position inserieren, als „paralog“ bezeichnet. Interne Introns, die gleiche Insertionsstellen in unterschiedlichen FUs bei verschiedenen Molluskenarten einnehmen, sind demnach „ortholog“.

Bei den beiden Vetigastropoden (*H. tuberculata* und *M. crenulata*) wurde mit jeweils 6 internen Introns die bis dato größte Anzahl interner Introns in Hämocyanin-Genen nachgewiesen. Das *A. californica*-Hämocyanin-Gen besitzt 45 interne Introns. 26 dieser internen Introns sind in Phase 0 (~58%), 6 in Phase 1 (~13%) und 13 in Phase 2 (~29%). Läge eine zufällige Insertion der Introns vor, so würde man eine Gleichverteilung erwarten. In diesem Falle ist aber eine deutliche Präferenz für Insertionen in Phase 0 erkennbar. Statistische Analysen an ursprünglichen Genen ergaben, dass „frühe“ Introns hauptsächlich in Phase 0 vorliegen (de Souza et al., 1998). Damit liefern die Untersuchungen am AcH-Gen erste Hinweise auf die Ursprünglichkeit interner Hämocyanin-Gen-Introns. Auch die „Intron-early“-Hypothese besagt, dass die „frühen“ Introns ursprünglich in Phase 0 vorlagen. Ihr zufolge hat sich das Genom der frühen Eukaryoten aus Mini-Genen zusammengesetzt, die für kleine Protein-Module (z.B. α -Helices) kodierten (Roy et al., 1999). Diese Mini-Gene wurden von nicht-kodierenden Sequenzen flankiert (Fedorov et al., 2001), die posttranskriptional keinen Einfluss hatten. Aus der Fusion dieser Mini-Gene sollen die Gene der späteren Proteinkomplexe entstanden sein. Die nicht-kodierenden Sequenzbereiche blieben bei dieser Zusammenlagerung erhalten und entsprechen den heutigen internen Introns, die nach der Fusion in Phase 0 vorlagen. Dadurch stimmte das Leseraster der neu kombinierten Exons überein, sodass weiterhin eine durchgehende Translation möglich war. Dieses Szenario ist

auch auf die Hämocyanin-Gene anwendbar, da die einzelnen FUs aus aneinander gereihten Modulen (α -Helices und β -Faltblattstrukturen) bestehen, wie die Röntgenstrukturanalyse von OdH_G-g belegt (Cuff et al., 1998; Abb. 1 D). Eine vergleichende Analyse der Strukturen und Sequenzen von ursprünglichen Proteinen ergab, dass Intronpositionen mit den Modulgrenzen korrelieren und wahrscheinlich die ursprünglichen Module voneinander trennten (de Souza et al., 1996). Durch die Analyse der AcH-Sequenzen konnten acht interne Intronpositionen identifiziert werden, die ein potentielles Proteinmodul bzw. Mini-Gen flankieren (Abb. 39). Zwei dieser Intronpositionen sind „FU-übergreifend“ erhalten geblieben. Sie befinden sich neben der α -Helix 4 von AcH-a und AcH-g. Des Weiteren konnten zwei Introns identifiziert werden, die sowohl „FU-übergreifend“ als auch „klassenübergreifend“ konserviert sind. Dabei handelt es sich um die Introns, die das β -Faltblatt 4 der FU-c von AcH und das β -Faltblatt 4 der FU-g von HtH1 begrenzen.

Einige dieser modulflankierenden Introns liegen nicht in Phase 0 vor. Diese Phasenverschiebung um ein oder zwei Basen könnte durch Intronsliding zustande gekommen sein. Dies ist zwar ein seltenes, aber durchaus reales Phänomen (Jellie et al., 1996; Stoltzfus et al., 1997; Rogozin et al., 2000; Sakharkar et al., 2001; Boudet et al., 2007). Legt man zugrunde, dass es durch Intronsliding zur Verschiebung der Insertionsstellen um bis zu 30 Nukleotiden kommen kann (Stoltzfus et al., 1997), so lassen sich weitere 19 potentielle Intronpositionen lokalisieren, die zwischen Protein-Modulen liegen (siehe Abb. 39). Diesen Ergebnissen zufolge könnte es sich bei diesen internen Introns um die ursprünglichsten, erhalten gebliebenen Introns handeln, womit ihre Entstehung zeitlich vor der Insertion der Linker-Introns einzuordnen wäre.

Innerhalb des AcH-Gens existieren 16 paraloge Introns, die in unterschiedlichen FUs an gleicher Position inserieren. Diese paraloge Introns untermauern die Annahme, dass ein ursprüngliches Intron schon vor bzw. im Laufe der Duplikationsereignisse inserierte und mitdupliziert wurde. Zehn dieser paraloge Introns liegen in Phase 0 vor, was zusätzlich auf deren Ursprünglichkeit hindeutet (siehe oben).

Weitere Hinweise auf die frühe Entstehung der internen Introns liefern acht Insertionsstellen, die an orthologen Positionen in Hämocyanin-Genen verschiedener Molluskenklassen identifiziert wurden. Das Intron e1/e2 des Hämocyanin-Gens von *O. dofleini* (Miller et al., 1998) ist ortholog zum Intron AcH-a5/a6 (Tab. 10). Demnach inserierte dieses wahrscheinlich bereits vor der Trennung der Cephalopoden und Gastropoden. Auch in den Hämocyanin-Genen von *N. nucleus* und *H. tuberculata* sind weitere Introns vorhanden, die zu AcH-Introns orthologe Positionen einnehmen. In diesem Zusammenhang ist das Intron a3/a4 von HtH

	Exon	Intron	Exon	Phase	Abgeleitete Aminosäure
AcH a1/a2	CCAAAG	GTATGT - (600+) - TCCCAG	GTCTGA	1	G
AcH g2/g3	GCACAG	GTACAC - (498) - CCCAG	GGCGCC	0	Q/G
AcH a4/a5	CTACAG	GTAAGC - (511+) - TTTCAG	CTACGA	2	S
HtH1 a3/a4	ATACAG	GTGAGA - (543) - TTCCAG	CTACGA	2	S
AcH h4/h5	TATGAG	GTAAGG - (1159+) - TTCTAG	TTCGAC	0	E/F
AcH a5/a6	GTGGAG	GTATAA - (687) - TTTCAG	GTTTGT	0	E/V
AcH h5/h6	TTTGAT	GTAAGT - (352) - CTGCAG	GTCCAC	0	D/V
OdH _c e1/e2	TTTGAA	GTAAGT - (1171) - TTCTAA	ATCTGT	0	E/I
AcH b2/b3	GTACAG	GTGAGA - (984) - TTTTAG	GTGAA	0	Q/V
AcH d1/d2	GAGCAG	GTATGC - (698+) - GTCCAG	GTGGAG	0	Q/V
AcH f1/f2	TTGCAG	GTAATG - (1242+) - AACAG	GTGGAG	0	Q/V
AcH b3/b4	AGAGAA	GTGAGG - (1259+) - TCCTAG	CGGCGA	2	N
NnH2 c1/c2	ATGATG	GTACAT - (1000+) - GGACAG	ACGGAC	1	D
AcH b4/b5	TTTGAG	GTAAGA - (895+) - CTACAG	GTCCAG	0	E/V
AcH f3/f4	TTTGAG	GTAATA - (898+) - TCACAG	GTTCAG	0	E/V
AcH g3/g4	TTTGAA	GTAAGT - (631) - CCCAG	GTCCAG	0	E/V
AcH c1/c2	GCACAG	GTAATA - (857+) - TTCCAG	ACTTCT	2	R
NnH1 e1/e2	GCATAG	GTACAG - (1000+) - ATTACAG	ACTACA	2	R
AcH c2/c3	TTACAG	GTCAGT - (855+) - TCACAG	TGGCCA	2	S
HtH1 g2/3	CAACAT	GTAAGA - (650) - CAACAG	GGACAC	0	H/G
AcH c4/c5	TGGCAG	GTCAGT - (905+) - TGACAG	GCTCTC	0	Q/A
AcH h3/h4	TGGCAG	GTAAGG - (1043+) - TCCAG	CAACTG	0	Q/Q
AcH c6/c7	CTGCAA	GTGAGT - (536+) - CCATAG	GAGCGA	2	K
AcH f5/f6	TGTCTG	GTGAGT - (834+) - CGACAG	AGGAAC	0	L/R
AcH e1/e2	CAAAAG	GTATTT - (636) - CAACAG	GTACGC	2	R
HtH1 f1/f2	CTGGAG	GTAAT - (698) - TTGCAG	ATCGCC	0	E/I
AcH f2/f3	GATGAG	GTGAGT - (234) - GTCCAG	GTGGTC	0	E/V
HtH1 a1/a2	GGAAAG	GTAACT - (659) - TGACAG	GCTCAA	0	K/A
AcH h1/h2	CTCAGC	GTATGG - (471) - CCCAG	GCATGC	1	G
HtH1 g1/g2	CTCAGC	GTAAGT - (964) - GACCAG	GCATGG	1	G

Tab. 11: Sequenzvergleich der Protosplice Stellen der orthologen bzw. paralogen Introns

Dieser Vergleich verdeutlicht die hohe Konservierung der Protosplice Stellen. Die Sequenzbereiche, die orthologe bzw. paraloge Introns gemeinsam haben, sind in den jeweiligen Zeilen zusammengruppiert. In der rechten Spalte sind die abgeleiteten Aminosäuren aufgelistet, deren Codons durch die Insertion der Introns unterbrochen werden. Im Falle von Phase 0 Introns werden jeweils die Aminosäuren vor und hinter der Insertionsstelle angegeben.

Die Gesamtheit der orthologen und paralogen Mollusken-Hämocyanin-Introns und die Hypothese, dass das Hämocyanin als Multidomänenprotein durch Duplikationsereignisse aus einer einzelnen Domäne entstanden ist (Lieb et al., 2001; Altenhein et al., 2003), untermauern die Vermutung, dass diese internen Introns schon im ursprünglichen Gen eines Monodomänen-Proteins vorhanden waren. Dieses Szenario wurde beispielsweise auch schon für das Hämoglobin-Gen von *Artemia* (Crustacea) beschrieben (Jellie et al., 1996).

Es ist unwahrscheinlich, dass in verschiedenen Klassen der Mollusken unabhängig voneinander an exakt den gleichen Stellen eine solche Vielzahl interner Introns inserierten. Demzufolge besaß das Vorläufergen eine hohe Dichte an Introns (mindestens 13 Insertionsstellen in einer Domäne von ca. 1200 bp), die teilweise bis heute in den Hämocyanin-Genen erhalten geblieben und bei den übrigen verloren gegangen sind. Diese Annahme steht im Einklang mit der „Intron-early“-Hypothese, bei der auch davon ausgegangen wird, dass die ursprünglichen Gene eine große Anzahl an Introns besaßen. Im

Laufe der Evolution sollen sowohl extensive Verluste als auch Insertionen neuer Introns stattgefunden haben, wobei die Verluste überwogen (Fedorova & Fedorov, 2003; Roy, 2003; Carmel et al., 2007).

Die Konservierung der Introns in den Hämocyanin-Genen der verschiedenen Molluskenklassen lässt vermuten, dass diese Introns regulatorische Funktionen übernehmen. Die Introns könnten beispielsweise Einfluss auf die Expression des Hämocyanin-Gens ausüben, indem sie den mRNA-Export und die Translationseffizienz beeinflussen (Bourdon et al., 2001; Rose, 2002, 2004; Le Hir et al., 2003; Nott et al., 2003; Rogozin et al., 2004; Boudet et al., 2007).

In den Hämocyanin-Genen existieren weiterhin interne Introns, denen keine orthologen oder paralogen Introns zugewiesen werden konnten. Lässt man Intronsliding als Ursache für eine Positionsveränderung außer Acht, so beläuft sich die Zahl dieser Introns in den Hämocyanin-Genen von *A. californica*, *H. tuberculata*, *O. dofleini* und *N. nucleus* auf insgesamt 27. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass diese Introns ursprünglich vorhanden waren und die orthologen bzw. paralogen Introns im Laufe der Evolution verloren gegangen sind. Zum anderen könnten die Introns aber auch der „Intron-late“-Hypothese zufolge (Cavalier-Smith, 1991) unabhängig und damit erst nach der Auftrennung dieser Arten in die jeweiligen Hämocyanin-Gene inseriert sein.

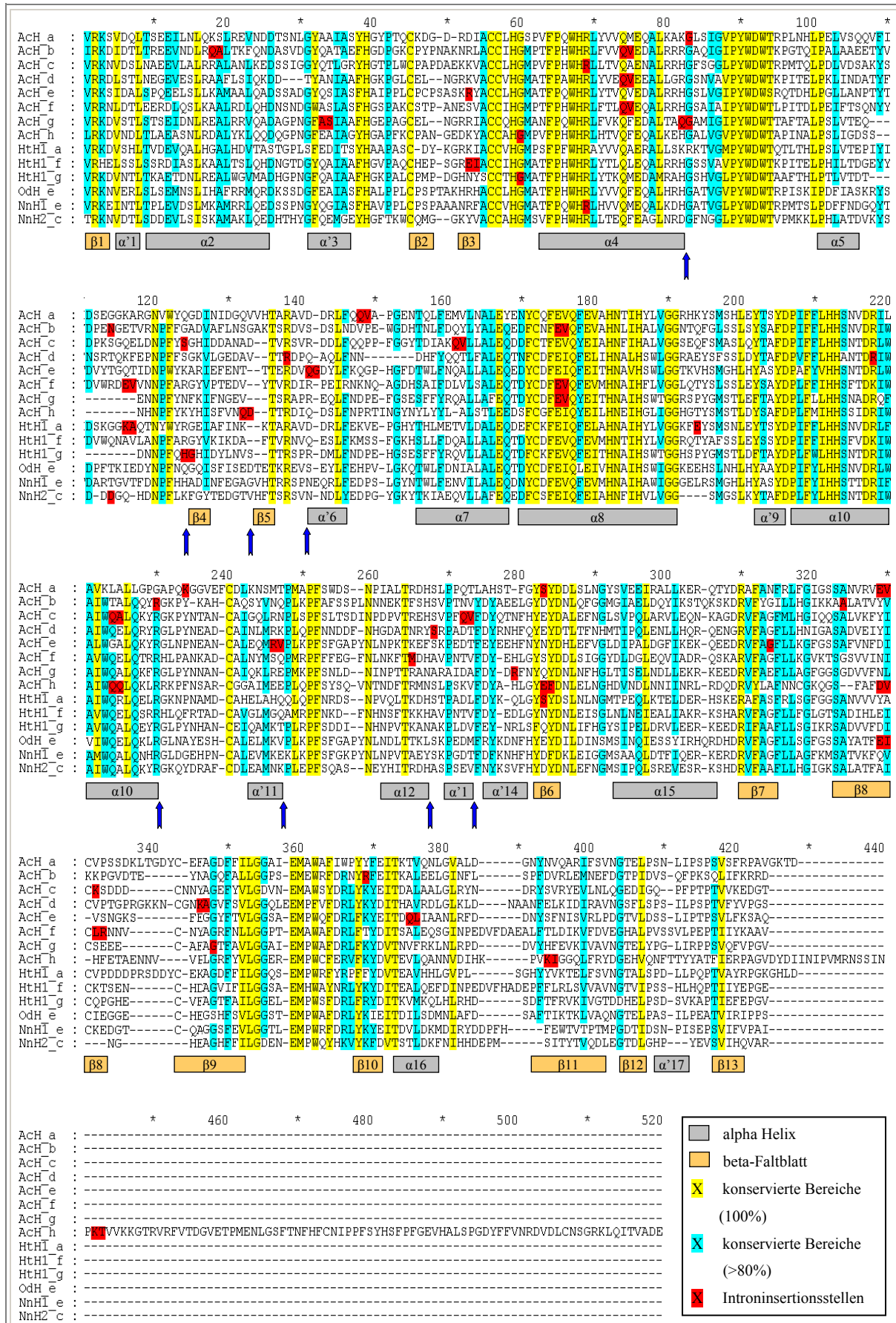


Abb. 39: Sequenzvergleich der Hämocyanin-Gene, die orthologe und paraloge Introns tragen

In diesem Alignment werden verschiedene FUs von *Aplysia californica*-Hämocyanin (AcH, FU-a bis -h), *Haliotis tuberculata*-Hämocyanin (HtH1, FU-a, -g, -f), *Octopus dofleini*-Hämocyanin (OdH, FU-e) und *Nucula nucleus*-Hämocyanin (NnH1 bzw. NnH2, FU-1e, FU-2c) im Hinblick auf die Lokalisation ihrer internen Introns verglichen. Der multiple Sequenzvergleich wurde mit ClustalX (Thompson et al., 1997) berechnet. Eine manuelle Nachbesserung des Vergleichs erfolgte mit dem Programm GENEDOC. Hoch konservierte Regionen sind farbig hinterlegt (100% identisch bzw. isofunktionell = gelb, 80% identisch bzw. isofunktionell = blau). Insertionsstellen der Introns sind mit roten Boxen markiert. Für Introns, die in Phase 0 inserieren, wurde jeweils die Aminosäure vor und hinter der Insertionsstelle rot markiert. Das Alignment verdeutlicht, dass das AcH-Gen sowohl orthologe als auch paraloge Introns mit anderen Hämocyanin-Genen gemeinsam hat. Die Lage der α -helikalen Bereiche und der β -Faltblattstrukturen sind von Röntgenstrukturdaten des OdH_G-g abgeleitet und lassen sich aufgrund der Ähnlichkeiten aller FUs von OdH_G-g übertragen (Cuff et al., 1998). Die blauen Pfeile markieren Intronpositionen, die ein potentielles Proteinmodul (α -Helix bzw. β -Faltblatt) flankieren.

3.2 Identifizierung der Sequenzen einer weiteren Isoform

Im Gegensatz zu den bisher eingehend untersuchten Gastropoden (z.B. *Haliotis tuberculata*, *Megathura crenulata*, *Rapana thomasi*) konnte in *Aplysia californica* mittels molekularbiologischer, biochemischer und immunologischer Methoden nur eine Isoform identifiziert werden (Lieb et al., 2004). Diese AcH-Isoform wird im Folgenden als Isoform 1 (AcH1) bezeichnet. Durch die Genbankrecherche und genomische PCRs wurden 13 Fragmente ermittelt, die sich von den cDNA-Sequenzen des AcH1 unterscheiden (Tab. 7). Entweder handelt es sich hierbei um die Sequenzen eines abweichenden Allels, oder aber um eine zweite Hämocyanin-Isoform. Die ermittelten Aminosäuresequenzen weisen zum AcH1 Unterschiede von bis zu 20% auf. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei wahrscheinlich um die Sequenzen einer weiteren Isoform handelt. Ähnliche Sequenzabweichungen wurden auch bei der Identifizierung der dritten Isoform von *M. crenulata* (KLH3) festgestellt. Sie weist in der Aminosäuresequenz einen Unterschied von 15% zum KLH2 auf (Hanisch, 2007). Auch KLH3 konnte mittels biochemischer und immunologischer Methoden nicht eindeutig nachgewiesen werden (Stahlmann et al., 1997; Hanisch, 2007). Erst ausführliche Sequenzanalysen erbrachten hier den Nachweis, dass eine dritte Isoform existiert. Vermutlich sind die Sequenzhomologien zwischen KLH2 und KLH3 bzw. zwischen den vermuteten AcH-Isoformen zu groß, als dass sie mit den angewandten biochemischen und immunologischen Methoden unterschieden werden könnten. Dass diese Methoden jedoch grundsätzlich geeignet sind, um Hämocyanin-Isoformen zu unterscheiden, belegen die Untersuchungen an HtH und KLH. Deren Isoformen 1 und 2 können eindeutig unterschieden werden. In beiden Fällen sind die durchschnittlichen Identitäten zwischen den Isoformen 1 und 2 mit nur 65 % jedoch deutlich geringer (Lieb et al., 2000; Altenhein et al., 2003).

Dass es sich bei den zum AcH1 abweichenden Sequenzen nicht um die Sequenzen eines Allels handelt, wird durch die Ergebnisse einer vergleichenden Sequenzanalyse innerhalb der Haliotidae untermauert. Diese ergab, dass die Gensequenzen der Isoform 1 von verschiedenen Haliotis-Arten bis zu 99% identisch sind (Streit et al., 2005). Demnach ist es im Falle von *Aplysia californica* unwahrscheinlich, dass die ermittelten Sequenzabweichungen zum AcH1 (bis zu 20%) auf das Vorliegen von Allelen zurückzuführen sind. Weitere Indizien dafür, dass es sich um die Sequenzen einer weiteren AcH-Isoform und nicht etwa um ein Allel handelt, lieferten Analysen der Intronsequenzen. Es konnten fünf Fragmente ermittelt werden, die neben variierenden Exonsequenzen zudem auch Intronsequenzen aufweisen, die sich von den korrespondierenden Intronsequenzen der Isoform 1 vollkommen unterscheiden.

Die Gesamtheit dieser Ergebnisse liefert deutliche Hinweise darauf, dass eine zweite Isoform des AcHs existiert. Zur Verifizierung der Isoform 2 bedarf es aber weiterer Sequenzanalysen. Nicht nur für Gastropoden, sondern auch für *Octopus dofleini*, *Sepia officinalis* und *Nucula nucleus* wurden mehr als eine Hämocyanin-Isoform nachgewiesen (Lieb et al., 2001, 2004). Die Duplikation der Isoformen scheint demnach ein Trend in der Evolution der Hämocyanine zu sein.

4. Molekulare Phylogenie und geographischer Ursprung der Haliotidae

In diesen Untersuchungen analysierte ich Hämocyanin-Genfragmente von insgesamt 12 Vertretern der Haliotidae. Es sollte gezeigt werden, dass Hämocyanin-Sequenzen ein geeignetes Mittel zur Analyse phylogenetischer Beziehungen auf intrafamiliärer Ebene darstellen. Da bekannt ist, dass in *Haliotis tuberculata* zwei unterschiedliche Hämocyanin-Isoformen vorkommen (Gebauer et al., 1994; van Holde & Miller, 1995; Altenhein et al., 2002; Streit et al., 2005), musste sichergestellt werden, dass von allen analysierten Spezies die orthologen, für Hämocyanin kodierenden Sequenzen amplifiziert werden. Im Vorfeld lagen noch keine Erkenntnisse über den Konservierungsgrad von Hämocyanin-Sequenzen zwischen Spezies innerhalb einer Familie vor. Da allerdings die Genstrukturen der beiden *H. tuberculata*-Isoformen (HtH1 und HtH2) in Bezug auf die Lokalisation und Phase der Introns nahezu identisch sind (Altenhein et al., 2002), konnte man annehmen, dass dies auch für weitere Hämocyanine der Haliotidae zutrifft. Um die korrespondierenden Genfragmente der anderen Spezies zu erhalten, setzte ich HtH1-spezifische Primer ein, die ein Intron umspannen (Abb. 32). Von allen analysierten Haliotidae konnten spezifische PCR-Fragmente amplifiziert werden.

In die phylogenetische Analyse wurden die Intronsequenzen miteinbezogen, da der Konservierungsgrad der kodierenden Bereiche zu hoch ist (79-97% Identität der Aminosäuren bzw. 80-95% Identität der cDNA), um die Beziehungen der 12 Taxa auflösen zu können. Die Hämocyanin-Sequenzen von HtH2 und beider Isoformen des *Megathura crenulata* Hämocyanins (KLH1 und KLH2) wurden als Außengruppe verwendet. Da die zu analysierenden Sequenzen der Haliotidae mit maximalem Unterstützungswert zur Isoform 1 gruppiert wurden, konnte gezeigt werden, dass ausschließlich HtH1-orthologe Fragmente für diese Studie amplifiziert wurden (Abb. 33). Die Intronsequenzen von KLH1, KLH2 und HtH2 wurden nicht in die Analysen einbezogen, da sie zu sehr divergieren. Die großen Unterschiede zwischen diesen Intronsequenzen sind nicht verwunderlich, da nach Kalkulationen früherer Studien (Bergmann, 2004; Lieb & Markl, 2004) die Duplikation der beiden Isoformen bereits vor etwa 340 Millionen Jahren stattgefunden hat und die Trennung der beiden Familien (Haliotidae und Fissurellidae) vor etwa 260 Millionen Jahren erfolgte. Somit war ein langer Zeitraum gegeben, in dem die Intronsequenzen unterschiedlich evolvieren konnten.

Der anhand der genomischen Sequenzdaten rekonstruierte Stammbaum lässt sich entsprechend spezifischer Indels der Intronsequenzen in zwei Abstammungslinien unterteilen: 1. Haliotidae der europäisch-australasischen Zone mit „kurzen“ Introns; und 2. Haliotidae der hauptsächlich nordpazifischen Zone mit „längeren“ Introns (Abb. 33). Bei den Spezies des europäisch-australasischen Astes sind die Indels im Bereich der 3'-Splice Stellen zu finden, bei den nordpazifischen Arten treten sie im Bereich der 5'-Splice Stellen auf. Diese beiden Hauptäste lassen sich anhand zusätzlicher Indels weiter unterteilen. In diesen spezifischen Sequenzmustern spiegeln sich die Abspaltungen wieder, die durch eine gegensätzliche geographische Verbreitung zustande kamen. Innerhalb der beiden Abstammungslinien können diejenigen Arten eindeutig voneinander unterschieden werden, die geographisch weit entfernt sind. So werden beispielsweise innerhalb des europäisch-australasischen Astes *H. midae* (Afrika), *H. asinina* (Australien) und zwei asiatische Arten (*H. diversicolor* und *H. discus supertexta*) mit einem Unterstützungswert von 89% zusammengruppiert, wobei *H. tuberculata* (Europa) in diesem Ast eine basale Position einnimmt. Im Gegensatz dazu ist die Auftrennung der beiden kalifornischen Gruppen innerhalb der nordpazifischen Abstammungslinie nur schwach unterstützt. Dies beruht aber weniger auf widersprüchlichen Daten, sondern eher darauf, dass sich die nordpazifischen Arten erst in jüngerer Vergangenheit aufgespalten haben, worauf die kurzen Astlängen im Stammbaum hindeuten. Anhand dieser phylogenetischen Untersuchung lassen sich Ursprung und Verbreitung der Haliotidae nachvollziehen (Abb. 40). Diese Studie bekräftigt die Annahme, dass die Haliotidae ursprünglich im Tethysmeer vorkamen und sich von dort ostwärts weiterverbreiteten (Geiger & Groves, 1999).

Die Topologie, die aus der Analyse der Hämocyanin-Daten resultiert, stimmt im Wesentlichen mit den Ergebnissen vorheriger Studien überein (Brown, 1993; Lee & Vacquier, 1995; Geiger, 2000). Diese basieren auf Allozymen (Brown, 1993), Lysin-Genen (Lee & Vacquier, 1995; Lee et al., 1995) und auf deren Kombination (Geiger, 2000). Auch diese Untersuchungen zeigen eine deutliche Auftrennung in eine nordpazifische und eine europäisch-australasische Abstammungslinie. Die Ergebnisse der Lysin-Daten und der kombinierten Analyse stimmen auch bezüglich der basalen Stellung von *H. fulgens* und der gemeinsamen Gruppierung der japanischen Arten innerhalb der nordpazifischen Gruppe mit meinen Ergebnissen überein. Ein detaillierter Vergleich dieser unterschiedlichen Studien ist jedoch nicht möglich, da die Anzahlen der einbezogenen Taxa zu stark divergieren. Die Ergebnisse meiner Analysen deuten jedoch darauf hin, dass Hämocyanin für phylogenetische Untersuchungen auf der systematischen Ebene der Arten geeignet ist und daher als Marker für

molekularphylogenetische Studien in Betracht gezogen werden sollte. Für nachfolgende Untersuchungen wäre es sinnvoll, die Anzahl der Taxa zu erhöhen, längere Sequenzabschnitte zu analysieren und weitere Vertreter der Vetigastropoden als Außengruppen mit einzubeziehen (z.B. Pleurotomariidae), um dadurch den Stammbaum robuster zu machen.

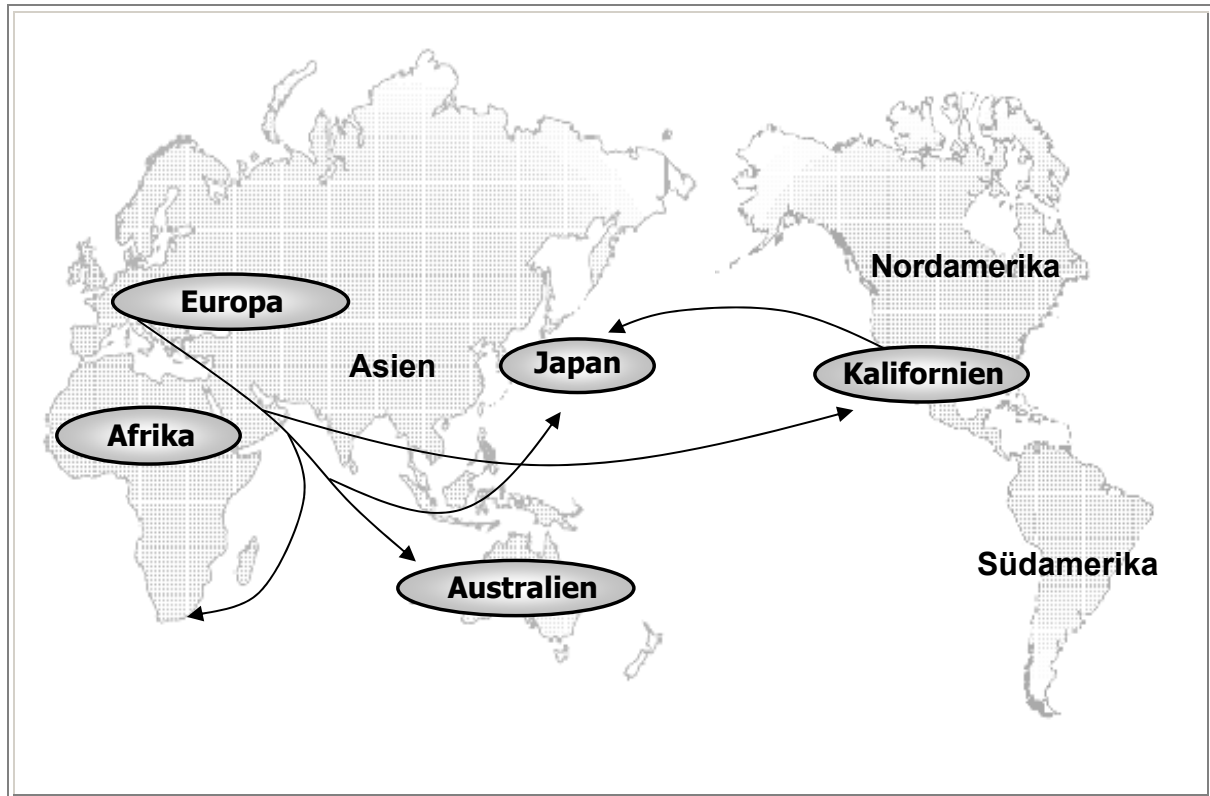


Abb. 40: Ursprung und Verbreitung der Haliotidae

Die phylogenetischen Untersuchungen belegen, dass die Haliotidae ihren Ursprung im Tethysmeer haben. Von dort ausgehend verbreiteten sie sich möglicherweise ostwärts und verstreuten sich in der asiatischen und amerikanischen Pazifikregion.

5. Molekulare Phylogenie der Polyplacophoren

Die Polyplacophoren (Chitonen) bilden eine ursprüngliche Klasse der Mollusken (Eernisse, 2004), die sich wahrscheinlich sehr früh in der Stammesgeschichte von den übrigen Mollusken abgetrennt hat (Ivanov, 1996; Scheltema, 1996; Barucca et al., 2006). Sowohl die traditionellen (Thiele, 1909; Bergenhayn, 1939, 1955; Smith, 1960; Van Belle, 1983; Kaas & van Belle, 1985, 1987) als auch die modernen Klassifikationen (Eernisse, 1984; Sirenko, 1993, 1997, 2006; Buckland-Nicks, 1995, 2006; Kaas et al., 1998, Brooker, 2006) beruhen hauptsächlich auf morphologischen Merkmalen. Die ersten molekularphylogenetischen Analysen führten Okusu et al. (2003) durch, wobei fünf verschiedene Gen-Loci untersucht wurden (Histon H3, 18S rRNA, 28S rRNA, Cytochrom-c-Oxidase und 16S rRNA). Diese Studien bestätigen im Allgemeinen die Ergebnisse der morphologischen Analysen von Sirenko (1993, 1997, 2006) und Buckland-Nicks (1995, 2006), wonach die Polyplacophoren in die zwei Ordnungen der Lepidopleurida und Chitonida (einschließlich Acanthochitonina und Chitonina) eingeteilt werden. Der Vergleich der molekularphylogenetischen (Okusu et al., 2003) und morphologischen Analysen (Sirenko, 1993, 1997, 2006; Buckland-Nicks, 1995, 2006) deckt aber auch grundlegende Gegensätze auf. So werden beispielsweise in Okusu et al. (2003) die Callochitonidae zu den Lepidopleurida gruppiert und nicht zu den Chitonida. Darüber hinaus wird in Okusu et al. (2003) *Lepidozonia* in einigen Stammbäumen bei den Mopaliidae (Acanthochitonina) eingeordnet, obwohl sie in den meisten morphologischen Klassifikationen innerhalb der Chitonina platziert werden. Diese widersprüchlichen Einteilungen verdeutlichen die Notwendigkeit neuer Marker für die phylogenetische Rekonstruktion der Polyplacophoren.

Da sich die Hämocyanin-Gensequenzen bereits für systematische Analysen innerhalb der Haliotidae bewährt hatten (Streit et al., 2005), sollten diese auch zur weiteren Klassifizierung der Polyplacophoren herangezogen werden. Es wurden, wie auch schon bei den phylogenetischen Untersuchungen der Haliotidae, partielle Gensequenzabschnitte der FU-f bis FU-g amplifiziert und für die Analysen verwendet. Die Intronsequenzen wurden hierbei jedoch vernachlässigt, da deren Größen zu divergent sind. Die Rekonstruktion der Stammbäume basiert demnach nicht auf den kompletten genomischen Sequenzen des Teilabschnittes der FU-f/g, sondern nur auf den kodierenden Sequenzen.

Der erstellte Stammbaum (Abb. 34) zeigt eindeutig die Auftrennung der Polyplacophoren in die beiden Ordnungen der Lepidopleurida und Chitonida, wie sie auch schon in früheren Studien beschrieben wurde (Eernisse, 1984; Sirenko, 1993, 1997, 2006; Buckland-Nicks, 1995, 2006; Okusu et al., 2003).

5.1 Lepidopleurida

Die unumstrittene Monophylie der untersuchten Lepidopleurida (Van Belle, 1983; Starobogatov & Sirenko, 1975; Sirenko, 1993, 1997; Okusu, et al., 2003) wird auch durch die Hämocyanin-Daten bestätigt. Die Stellung der drei analysierten Lepidopleurida-Arten (*Hanleyella oldroydi*, *Leptochiton alascensis*, *Nierstraszella lineata*) innerhalb dieses Astes kann aber aufgrund der niedrigen Unterstützungswerte nicht weiter aufgelöst werden. Die basale Stellung der Lepidopleurida im Stammbaum deutet darauf hin, dass es sich hierbei um ursprüngliche Vertreter der Polyplacophoren handelt. Dies wird dadurch untermauert, dass sie als einzige Vertreter der Polyplacophoren im Sequenzalignment mit anderen Molluskengruppen keine Deletion im C-terminalen Bereich der FU-f aufweisen (Abb. 41).

HtH1	:	YKYDITEALQEFDINPEDVVFHADEPFFLRLSVVAVNGTVIPSSHLHQPTIIEPGE
HtH2	:	FKFDITHVLENAGISPEDVFDAEPEFYIKVEIHAVNKTMI PSSVI PAPTIIYSPGE
Lepitochitona	:	YKYDISHAVKNLGLDLEDVFQAQEPFYLKLDIVAVNGTVLPSSAI PAPTIIYKPA
Hanleyella	:	YKSDITHAVQSLGLNLEDVFTAQEPFYLKLDIVAVNGTVLPSSAI PAPTIIYEPAR
Nierstraszella	:	YKFDITHAVEELGLHLEDLFKAQEPFYPKLAIIVSVDGDALPSSSI PAPTIVYQPAS
Leptochiton	:	FKYDITGAVNKLGLSLG-----EDSYLDVSIIVAVNGTELSNDVLPAPTLSYVPEAT
Nuttallina	:	FKYDITSPLEKLGANLE-----EDRFYLDVSIIVAVNGSKLSNDVI PAPTLLTYVPEAA
Nuttallochiton	:	FKYDITPALKKRLGVDLE-----EDTYLDIIVAVNGTKLSNDVLPAPTLLTYAPAT
Cryptoplax	:	FKYDITGALKKLGIALR-----DERESFKVYIIVAVNGTTL PNTVIEDPTLLTYVPEAV
Notoplax	:	FKYDITAALKKLGVSRLR-----DERETFEVTIIVAVNGTRL PNSVI QAPTFTYVPEAV
Acanthochiton	:	FKYDITGALKKLGISLR-----DERETFEVSIIVAVNGTELPDDII PAPTFSYVPEAV
Plaxiphora	:	FKYDITGALKKLGVALQ-----NGVFFLNINIIVAVNGTKLPNNII PAPTSEFVPEAK
Onithochiton	:	FKYDITPALKKLGVSLS-----EDLEHLKITIIVAVNGSTLANDVI PAPTLLTFVPEAA
Tonicia	:	FKYDITGALKKLGVSLS-----EDLEHLKITIIVAVNGTTL SNDVVPMPTLLTFVPEAS
Loricella	:	FKYDITSAALKKLGVDLV-----KDLFHEIITIVAVNGTTL SNDVVPPPTLLTFVPEAS
Stenosemus	:	FKYDITSAALKKLGVDLD-----EDLEHLKLSIIVAVNGTALANDVI PAPTFSFVPEAS
Lepidozona	:	FKYDITPALKKLGVSLLQ-----EDLEHLQLSIVAVNGTALSADVL PAPTLLTFEPA
Lorica	:	FKYDITSTVKKLGLALN-----EDQFHLELRIVGVNGTVLSNDVLPAPTLLTFVPEAS
Callochiton	:	FKYDITAALKKLGIVLD-----KDPEFLKIAIIVAVNGTTL SNDVIPTETLSYVPEAA

Abb. 41: Das Alignment des C-terminalen Bereichs der FU-f weist bei den Chitonida eine Deletion auf.

Durch die spezifische Deletion in der Sequenz der FU-f können die Chitonida (orange Box) eindeutig von den Lepidopleurida (grüne Box) und dem Gastropoden *Haliotis tuberculata* (HtH1 und HtH2) unterschieden werden.

5.2 Chitonida

Sämtliche Chitonida weisen, wie bereits in Kapitel D 5.1 erwähnt, im Sequenzvergleich mit den Lepidopleurida und *Haliotis tuberculata* im C-terminalen Bereich der FU-f eine Deletion von 5 Aminosäuren auf (Abb. 41). Diese Deletion scheint demnach ein charakteristisches Merkmal der Chitonida zu sein, wodurch eine eindeutige Einteilung in Lepidopleurida oder Chitonida möglich ist.

Diese beiden Ordnungen lassen sich auch anhand morphologischer Merkmale unterscheiden, wobei die Struktur der Eihüllen ein besonders markantes Charakteristikum darstellt. Bei den Chitonida weisen die Eier eine ausgeprägte Oberflächenstruktur auf, wohingegen die Eioberfläche der Lepidopleurida glatt ist (Buckland-Nicks, 2006). Zudem lassen sich die Chitonida aufgrund ihrer besonderen Gametenstruktur und ihres einzigartigen Fertilisationsmechanismus von den Lepidopleurida abgrenzen (Buckland-Nicks, 2006).

Die Stellung der Gattung *Callochiton* konnte in bisherigen phylogenetischen Analysen nicht eindeutig aufgeklärt werden. *Callochiton* nimmt nach morphologischen Gesichtspunkten eine intermediäre Stellung zwischen Lepidopleurida und Chitonida ein, da diese Gattung Merkmale beider Ordnungen besitzt. In vielen Klassifikationen, so auch beispielsweise in der phylogenetischen Analyse von Buckland-Nicks (2006), gruppiert sich *Callochiton* in basaler Stellung innerhalb der Chitonida. In den Analysen von Okusu et al. (2003), die zum ersten Mal DNA-Sequenzen als Grundlage für die Systematik der Polyplacophoren verwendeten, wird *Callochiton* als Schwestergruppe der Lepidopleurida eingeordnet. In der phylogenetischen Rekonstruktion meiner Arbeit wird die Gattung *Callochiton* durch die Art *Callochiton bouveti* vertreten. Der auf der Analyse von Hämocyanin-Sequenzen basierende Stammbaum zeigt eindeutig („Bootstrap“-Wert = 100), dass sich *Callochiton bouveti* nicht zu den Lepidopleurida gruppiert, sondern eine Innengruppe der Chitonida bildet. Diese Einordnung wird zudem dadurch bestätigt, dass *Callochiton bouveti* die für Chitonida „typische“ Deletion in der FU-f besitzt.

Des Weiteren zeigt der Stammbaum die von Buckland-Nicks (2006) und Sirenko (2006) beschriebene Auftrennung der Chitonida in die Acanthochitonina und Chitonina. Meiner Analyse zufolge bilden beide Unterordnungen ein Monophylum, wobei jedoch die monophyletische Stellung der Acanthochitonina relativ schwach unterstützt ist („Bootstrap“-Wert ~80). Damit bleibt die Monophylie der Acanthochitonina weiterhin anfechtbar (Sirenko, 1993; Okusu et al., 2003). Durch die Analyse längerer Hämocyanin-Sequenzen und zusätzlicher Taxa könnte die systematische Stellung der Acanthochitonina möglicherweise eindeutig aufgeklärt werden.

5.2.1 Chitonida: Acanthochitonina

Der bisherigen Zuordnung von Sirenko (1993, 2006) entsprechend bilden *Lepidochitona cinerea* und *Nuttallina fluxa* eine Gruppe innerhalb der Überfamilie Mopalioida. *Nuttallochiton mirandus* legt sich als Schwestergruppe zu diesen beiden Arten (nach Sirenko, 2006), was jedoch nur durch niedrige „Bootstrap“-Werte unterstützt ist.

Acanthochiton fascicularis, *Notoplax conica* und *Cryptoplax iredalei* werden in die Überfamilie Cryptoplacoidea eingeordnet. Die Gruppierung dieser drei Arten stimmt mit der Klassifizierung nach Sirenko (2006) überein.

Plaxiphora aurata ist meiner Analyse zufolge ein Vertreter der Cryptoplacoidea, was durch hohe „Bootstrap“-Werte (~92) unterstützt wird. Diese Einteilung korreliert mit den Ergebnissen von Okusu et al. (2003), widerspricht jedoch den morphologischen Analysen von Sirenko (2006), wonach *Plaxiphora* zu den Mopalioida zählt.

5.2.2 Chitonida: Chitonina

Die beiden Arten *Tonicia chilensis* und *Onithochiton hirasei* werden mit hohen Unterstützungswerten als monophyletische Gruppe zusammengefasst und gehören zur Familie der Chitonidae (nach Sirenko, 2006). *Stenosemus albus* und *Lepidozona interstincta* werden im Konsens zu Sirenko (2006) als Ischnochitonidae zusammengelagert, was aber nur durch niedrige „Bootstrap“-Werte belegt wird. Sehr gut unterstützt ist hingegen die Zugehörigkeit von *Lepidozona interstincta* zu den Chitonina. Diese Art konnte durch die molekularen Analysen von Okusu et al. (2003) noch nicht eindeutig zugeordnet werden. Jedoch wiesen Untersuchungen zur Struktur der Spermien und Eizellen schon auf die Zugehörigkeit zu den Chitonina hin (Eernisse, 1984, Buckland-Nicks, 2006).

Die Stellung von *Lorica volvox* und *Loricella angasi* kann in meiner Analyse nicht eindeutig geklärt werden. *Lorica volvox* wird basal innerhalb der Chitonina gestellt, *Loricella angasi* ordnet sich als Schwestergruppe zu den Chitonidae ein. Nach Sirenko (2006) werden die beiden Arten jedoch als Loricidae zusammengruppiert.

E ZUSAMMENFASSUNG

Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen an den zwei Gastropoden-Arten *Haliotis tuberculata* und *Haliotis asinina* zeigten, dass diese jeweils zwei unterscheidbare Hämocyanin-Isoformen (HtH1/HaH1 und HtH2/HaH2) besitzen, die in unterschiedlichen Mengen in der Hämolymphe vorkommen. *In situ*-Hybridisierungsversuche an *H. asinina* ergaben, dass die beiden Hämocyanin-Isoformen sowohl entwicklungspezifisch als auch gewebsspezifisch exprimiert werden. Die Transkription der Hämocyanin-Gene setzt bereits 9 Stunden nach der Befruchtung ein und ist von diesem Zeitpunkt an in allen Stadien der Larvalentwicklung nachweisbar. Während dieser Entwicklungsphase sind die Expressionsmuster der beiden Isoformen weitgehend überlappend, wohingegen in adulten Tieren in verschiedenen Geweben isoformspezifische Expressionsmuster auftreten. Diese Ergebnisse deuten auf funktionelle Unterschiede der beiden Hämocyanin-Isoformen hin, und somit darauf, dass Hämocyanin neben dem Transport von Sauerstoff noch weitere Funktionen ausüben könnte (Streit et al., 2005).

Weiterhin wurden Untersuchungen zur Primär- und Sekundärstruktur der Hämocyanine aus *H. tuberculata* und zwei weiteren Arten (*Megathura crenulata* und *Aplysia californica*) durchgeführt. Von den Vetigastropoden *M. crenulata* und *H. tuberculata* konnten die für die beiden Hämocyanin-Isoformen kodierenden cDNA-Sequenzen vervollständigt werden. Von HtH1 und HtH2 wurden zudem die Gensequenzen komplettiert. Die Sequenzen des KLH1-Gens wurden bis auf 24 bp der 5'UTR und die für das Signalpeptid 1 kodierenden 33 bp ermittelt. Erstmals ist es gelungen, Promotorsequenzen von Mollusken-Hämocyanin-Genen zu sequenzieren. Für HtH2 wurden 181 bp und für KLH2 906 bp des Promotors analysiert. Beide Gensequenzen weisen das konservierte Sequenzmotiv der TATA-Box auf. Wie bei *H. tuberculata* treten auch bei *M. crenulata* die beiden Isoformen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen in der Hämolymphe auf. In den bisher analysierten Sequenzen dieser beiden Gastropoden konnten keine regulatorischen Elemente identifiziert werden, welche die differentielle Expression bedingen könnten. Die Genstruktur des Hämocyanins von *A. californica* konnte ebenfalls aufgeklärt werden. Die kodierenden Bereiche des AcH-Gens werden durch insgesamt 45 interne Introns fragmentiert. Im Gen liegen neun Insertionspositionen vor, in denen paraloge Introns inserieren. Zudem sind neun Introns ortholog zu internen Introns anderer Mollusken-Hämocyanin-Gene. Im Fall der paralogen und orthologen Introns handelt es sich um sehr ursprüngliche Introns, die bereits vor der Radiation der Mollusken inserierten. Damit widerlegen diese Ergebnisse die bisherige

Annahme („Intron late“-Hypothese), der zufolge die Insertion interner Introns erst nach der Trennung der Gastropoden und Cephalopoden eingesetzt haben soll. Im Zuge dieser Sequenzanalysen ergaben sich zudem Hinweise auf die Existenz einer weiteren AcH-Isoform, da 13 Fragmente ermittelt wurden, die in den kodierenden Bereichen Sequenzunterschiede von bis zu 20% zu AcH 1 aufweisen.

Die detaillierten Studien der *Haliotis*-Hämocyanine deckten einen weitreichenden phylogenetischen Informationsgehalt der Hämocyanin-Sequenzen auf. In weiterführenden Analysen wurden Teilsequenzen der Hämocyanin-Gene von 12 verschiedenen *Haliotis*-Arten amplifiziert. Der daraus rekonstruierte Stammbaum liefert entsprechend spezifischer Indels eine deutliche Auftrennung der Haliotidae in eine nordpazifische und eine europäisch-australasische Abstammungslinie. Anhand dieser Analyse lassen sich der phylogeographische Ursprung der Haliotiden aufzeigen (Streit et al., 2006) und deren Wanderungsbewegungen nachvollziehen. Hämocyanin-Daten wurden des Weiteren für phylogenetische Analysen auf höherem taxonomischem Niveau eingesetzt. Innerhalb der Klasse der Polyplacophoren wurden interfamiliäre Verwandtschaftsverhältnisse rekonstruiert. Für diese Analyse wurden Teilsequenzen der Hämocyanin-Gene 17 unterschiedlicher Arten ermittelt. Die phylogenetische Untersuchung zeigt, dass sich die Polyplacophoren eindeutig in die beiden Ordnungen der Lepidopleurida und Chitonida auftrennen, da die Chitonida eine spezifische „Deletion“ aufweisen. Anhand dieses Merkmals kann auch *Callochiton bouveti*, der diese „Deletion“ besitzt und dessen phylogenetische Einordnung bisweilen umstritten war, eindeutig den Chitonida zugeordnet werden. Innerhalb der Chitonida bilden sowohl die Chitonina als auch die Acanthochitonina monophyletische Gruppen.

F ANHANG

1. Abkürzungen

1.1 Allgemeine Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
C	Cytosin
cDNA	Copy- oder auch complement-DNA
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
COI	Cytochrom-Oxidase I
Da	Dalton
dCTP	2'-Desoxy-Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DS	Downstream
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (double strand DNA)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymintriphosphat
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid)
FU	Functional Unit (Funktionelle Domäne, Funktionelle Einheit)
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (Mittelwert $g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
GITC/GTC	Guanidinthiocyanat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O bidest	Bidestilliertes Wasser
Hc	Hämocyanin
Ig	Immunglobulin, Antikörper
IP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranoside
JTT	Jones-Taylor-Thornton
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase (1000 Nukleotide)
kDa	Kilodalton, 1000 Dalton

MCS	Multiple cloning site
(m)M	(milli)molar
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäure Natriumsalz
MYA	Million years ago
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NBT	p-Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion)
Pfu	Plaque forming units (Plauebildende Einheiten)
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure (single strand DNA)
T	Thymin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS/TBST	Tris-Buffered-Saline / and Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetracyclin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
UE	Untereinheit
US	Upstream
UTR	Untranslated region (Untranslatierter Bereich)
UV	Ultraviolet
v/v	Volumen pro Volumen (volume/volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight/volume)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galctosid

1.2 Abkürzungen der Hämocyane

Hämocyane	Tierarten	Klassen
AcH	<i>Aplysia californica</i> -Hämocyanin	Gastropoden
Hah	<i>Helix aspersa</i> -Hämocyanin	Gastropoden
HaH	<i>Haliotis asinina</i> -Hämocyanin	Gastropoden
HpH	<i>Helix pomatia</i> -Hämocyanin	Gastropoden
HtH	<i>Haliotis tuberculata</i> -Hämocyanin	Gastropoden
KLH	<i>Megathura crenulata</i> -Hämocyanin	Gastropoden
NnH	<i>Nucula nucleus</i> -Hämocyanin	Bivalvia
NpH	<i>Nautilus pompilius</i> -Hämocyanin	Cephalopoden
OdH	<i>Octopus dofleini</i> -Hämocyanin	Cephalopoden
RtH	<i>Rapana thomasiana</i> -Hämocyanin	Gastropoden
SoH	<i>Sepia officinalis</i> -Hämocyanin	Cephalopoden

1.3 Abkürzungscode der Aminosäuren

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

2. IUPAC-Codes für degenerierte Nukleotide

Code	Entsprechende Base(n)	Code	Entsprechende Base(n)
M	Adenin oder Cytosin	K	Guanin oder Thymin
R	Adenin oder Guanin	B	nicht Adenin
W	Adenin oder Thymin	D	nicht Cytosin
S	Cytosin oder Guanin	H	nicht Guanin
Y	Cytosin oder Thymin	V	nicht Thymin
N	Jedes der Nukleotide		

3. Verwendete Primer

Name	<u>upstream/</u> <u>downstream</u>	Sequenz in 5'-3' Orientierung
Aplysia B US	US	GAGGTCAACGACCTTAGACAG
Aplysia DS 4	DS	GCACAGGCTCTTTGTCGTACAG
Aplysia DS 5	DS	GTGACGCCACAAACAGATACAG
Aplysia DS 4/5	DS	CTTGTCCCAGAATAGTACAGATCG
Aplysia DS 6	DS	CAAGCCCCAGTGCCAGCAAAAG
Aplysia Exon-D3 US	US	GGACGTGCTGAGTACTCGTTCTC
Aplysia Exon-3 DS	DS	GAGGAGACTTACGTTGATCCAGAG
Aplysia Intron d/e US	US	GTGTTCTAATGTGGTTTGCTCC
Aplysia Intron e1/e2 DS	DS	GCAATCAGTCCTTGCCAGAATG
Aplysia US 5	US	GATTTGGGCCATCTGGCAAG
Aplysia US 6	US	CGAAAGACAAGAGGCTGACG
Aplysia 3'UTR DS1	DS	GGGTTTCATCCTGGAGTGCAGTTTTAC
Aplysia 3'UTR US1	US	GGACCACAGTCTTTCTCTTTAGC
Ch-250-g DS	DS	CAATCCGTTTTTGCAAGG
Ch-306-f US	US	GAGGTAGACACGAATATTCTG
Hc-FS-F US	US	ATGCCATGGTCATTYGACMGAACATT
Nuttallina-for-g	US	GCGCTTCGAGCAGTACAAGCCG
HaH-1f 176 US	US	CCGACTCTACAAGTATGATATCAC
HaH-1g DS	DS	CCATGGAAAACCCGCTATGTG
HaH-2f D	US	GCATTAGCCCAGAGGACGT
HaH-2f Ü	DS	ACATTGCTGGCTCTGGGGTGA
HaH-2f 186 US	US	GGTCATTTGACAGAACTACAAG
HaH-2g 166 DS	DS	GCAATAGCAGCTTTCCACGG
HtH1a Race DS	DS	CGAGCGGGCACTGTTGTCCAAACGG
HtH1 f 1a	US	GTTTTCCATGCTGATGAA
HtH1 g 4a	DS	CCCATGCCTGATGGCCAC
HtH2a Race	DS	CCGTAAGGGACTGGACACAGCATC
HtH2-GW-DS4	DS	ATGTGGACGATCGTGGCGTTGTTATTG
HtH2 P DS1	DS	CGGAGCGCCAGCAGGATGTGTTG
HtH2 P US1	US	CTACTGGATTGATCATGTGGACG

KLH1a gen US	US	CTGGTCAGAAAGAGTGTGGAGCATC
KLH1 Signal3	US	CGGTCAGGTTGCTTATAGTCGTGTTGG
KLH1DS7	DS	GATGCGAAGTTGATACAGAGAAG
KLH1h US1	US	GAAAGTCACGGTGGATATGAAC
KLH1 P US 7	US	GGCTGCTTATAGTCGTGTTGG
KLH1 P DS9	DS	CAAAGGGATGTACCAAAGAGG
KLH1 UTR DS2	DS	GCGTTGAGGATGTTTCTGAAACGTTTGG
KLH2 5'UTR US	US	ATCACCAGCCATCTGGTTTGATC
KLH2 Intron DS	DS	CGATGAGTTTTGAAGATCACTG
KLH2h US1	US	CCTGATGTACGAGGAAATAGTATTCAG
KLH2 UTR DS	DS	GTATTAGAGACATAGTGTCGC
PYWDW US	US	GGYYTNCNTACTGGGAYTGGAC
PYWDW DS	DS	GTGTCCARTCCCAGTANGG
WAIWQ US	US	TGGGCNATRTGGCARGC
WAIWQ DS	DS	GCYTGCCAYATNGCCCA
AP1	US	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	US	ACTATAGGGCACGCGTGGT
UAP	US	GGCCACGCGTCGACTAGTAC

4. DNA-Sequenzdaten

4.1 Sequenzen des *Megathura crenulata*-Hämocyanins (KLH)

4.1.1 KLH1

AGGCTGGCGATTTGGAGAGGCGCAATGCTGTCTGGTCAGGTTGCTTATAGTCGTGTTGGCTTTGGCCAA
 TGCAGAGAACCTGGTCAGAAAGAGTGTGGAGCATCTGACTCAGGAAGAGACCCTGGACCTGCAGGCTG
 CCCTGCGTGAGCTGCAGATGGACTCATCCAGCATTGGTTTTCCAGAAAATAGCTGCTGCTCATGGCGCG
 CCCGCATCTTGTGTGCATAAGGACACTTCTATAGCTTGGCTGTATTACGGCATGCCTACTTTCCCGCA
 CTGGCACAGGGCGTACGTAGTTCACATGGAGCGAGCTCTGCAGACGAAGAGGCGTACTTCTGGCCTGC
 CTTACTGGGA

Abb. 42: Klon „KLH1 5'UTR-a" umfasst die cDNA Sequenz von der 5'UTR bis in die FU-a. Blau: 5'UTR, rot: Signalsequenz, orange: Teilsequenz der FU-a.

GAATTCCTCTGGAGTGCAATATTTAGAAATTGGTGAAGCTCCTGCATATTTTATTGCATTGG
 TTACACATGTGGTGCTTCATTTGTATTGGCTGATGTTTCATAATTCATGATTTTTAGAATTAATAAGA
 ATACGTTATCAAAACAAGAAACAGCATATAATGTCATAAATTATGTATTATATGCAAAAAGAGCACCATG
 TGCTCGCTATGGTACACTTATTGTGTATATATTGTTACAGTTAAATATTCATGTTATGAGATAAGCTG
 CATCACATATCCTTCGTTGAGTATGTTGAGCATTACGAAAACCTTCTACATGTAAATGGCATATCTG
 TTTTCATTTGGATGCGCATGCAATTATTTTTATCGTTGTTAATCTAATGCAACGCCTGACATGCTTC
 AAATGAAACCGATACTACTCTGTACCCTTCACAGCTGAATATGTATCTGAATAATTTATTATTTTCCG
 TTATTTTGGTGAGCGTTGCTTGACATGTAGTGATGCGCTTCAACGAACGTATGTTTATGGCAGGGTGT
 CATTTTCTCTTGAATTGACTGTTTTCGATCACGTGACCACACCTGGCTATTCTGGATAGCGGCGGCCA
 TGCTGGAGGACCAGCTGCATTGTAAACACTGTAGCAACTGCAGCTAAATTTAATCACACACGCTTTTT
 CTGTCACACATCGAAAAGTGATGACTTAAAAGTGCTGCAGTATTATTTGGCTTGCTGGCAGGGTACCG
 GTTTAGGGTTATTGGAGATTAAGGTCTAATTTGTCGCCAAGAAAACACAATGCGCACGACATCTTTGC
 GTAACCTGGCACCTGTGATCAGCCACTGACTACGGGTCAAAGAAACCGCTTAATCCCATCTTGTGCTA
 AGAAAAGCAATAAAAATGTTGTTGTTTTGTAATTAAGACAATGTCTGTACTTATAATTGTCACATTA
 ATCGTGGGCCATTGTGGAAGTTGAGAGTTATCTGATATTTACATTTTCGCAGTTCACATTGAATGTCA
 AATTAACCCACATTTTACTTACTTGATAATTCCTCGCACATAATTTACTATTCAGTGCAGTAAGAGAT
 AAAACCCGTTGCCCTTATTTATATATTTTTTAAATGTTGATTTGACACTGTATCTGGAATAATTTTG
 ACAGCACAAAAAACAGATTTTATTTCTGTGAACAGAAGTTGACGTGCGACTCTCGAGTGAAATACAT
 GCATTTTCTTGCACTCGGAAATGATTTGTGGTCAAATATTTACGAAAGAAAATTCCGAATCATAAC
 TAATTGTCGTTTTTTCTGGTTCTTTGTCCGTATACTGTGAAAAAATTATACGTATACAGTTTGTTGC
 CAAATCCATGTTTTTGCACGGAGTCGAGGTTTATGGTGAATATTTATATGAATTATGGATACTTTCA
 TTTTCTGCTGCAACCTATTTGCNATTTAAGTGTCTACAACTGTGACGTGACCCTGTCACCAATGAAA
 AACGGGATTTATTACATTCTTTTGCACGCCCCAAGACTGCCGCGGATGGACGGGACCCGATGGACA
 TTACCTCTCTGCATTTGCAGTCAAACATTGACACGGGACAGTTGAGAAAAGCTACAAAACACAACCTT
 ATTTGTGTTATTTAGCATCACACTTTTTGGATATTGAGGATGTGCATTTTAGATCGACAGACAACCTAT
 CAAAGTTGGAGATCGAAGAGCTATTTTTCAAATAACCAGCTACAACACAATTTAGGTTAGTAAATTT
 TAATTATTTGGAATACATTTTACGTAATATGTGCCGTGAGCTGTGACTGAAAGGTGAGTATATCCCT
 TCACTACCAATTTTCTTCAGATATCTAAATAAAAGGCGTGATATCTATCTTCTTTCTTCTTCTTCTT
 CGTGATTTTGTGAACCAATAAACATATGTGCGAAATGAAAAAAACCTTCTTGTAAATAATCTATAA
 CCAAATCTGCAACTACACATCAAGTACTTTGCAAAATAAACATTATAACATTCAGTGCAGTACTGATCT
 ATAAGCCTAATGAAGGTGTAATTTAAACTGTAGCTCTCATAGGTGTCATTCTCTGGACCTCCAGAATG
 GCCGCCAGATTAGTTACCGGAAGTAGCTTGACGTCATTCGAAACCTATCAATATGTATTGAAACCGAT
 GTCTGATGGCGGGATGACTCACCGTAATGCTGTTGCCTTTGTTGGCGCTTTATGAGAGGATACGTGAC
 ATTATCTCCATGGTGTACCGCAGGATCTGCATTATGGCTATTATTTTTCTTGTATTCTTTTTAAA
 AGAGCCGCTGAGCAGTCTTTGCGGCGTGGTGACCGTGAGCGATAGGCGTCGGACTCGTGATATGACGA
 CGGCTAGGTGCGGGTTCGATCTTTGCTAGCGGTGTACGTTGTATCCTTTGACAAGATGCTTGACTC

AGCTTGCCCCAATTGGATCCAGCTTAAAATGGGTATTTATTATGAATAATAGAGAACTTCTTCTTCGT
CTTCTTTATTATTATTGTTTTCCAATTTACACATCAGCTCATGGAAACATTGCAAGAGAGTTCAATCAT
CCAAATCTATTTCGTCGCGAGGAGAGTCCATTGTTACTCAACGGCGGCATGAGTGCTCATGGACTCCCG
TGAGTTCTCATTAAACGTTCACTGCATGTTCCCTCAACGGCGGCATGAGTGCTCATGGACTCCTGTGAG
TCCCCCTATTGACGCGCACTGCATGTTCCCTGCACCACGGGTAACCTCCGTTTCTTGCTCTGTAATGGC
TACCACCTAACATAAGAAGAGATCCACCATTCAAACACTGCCGTTGGTGGGGACCCCGTGAAAATTTT
CCGTCTCTCAATGTATGTGACAGATTGGAAATCGATGCCTCTGATTGGCTGTTTACAGTAGTGACCCG
GGGTCAAGGACCCGAGGTCATGCTGCCGGGACGCACATCTGTAACGCCAAATGAACCTAAAATGACA
CTTTGGTAACGTGTGTAAGAAAACAGATTATTATAAGAGTGTCCCTTTTCGATGGCTTGGTACTTTTGTA
AACAACTCGTGTGAGATCCTTGGTATCTAACAGACACTCGTTTAGTAATCTCTATTTATCTCTGAACC
CACCACCTTTCAGCGTGAGTGTTTTAAACGCATGCCACGTGTCCTGTGGGGTCCGGTGATGCAACAGTT
CTGAATAATACGACCGCATGCTCATATGGAAGCCTGGTGTGTAGCTAATAACAAGGATGTACGTGCGT
GTCTTTAAACACAGATGCCCTCAAGGTTTTGCCATGTCTATGATTATAGGTCTGTTCCGGGTAAGAAC
TGTTGACGGTGTTTTAGTGTGGCAGGGTGGGAAGAGGACACACTGGCAGGTAAATGTCCTTGCATTGA
TTGCGCACATTTCCGACCGATTGAACCGTCATTTAAGGTAAATTGACCTCTTCCAGCAAATGTAATC
AATTTAAGCATATCAAGTTGGATTATCGCCCTTAGTGATGTTGGGATAGCGACACACATTAGTTACA
CTGGACAACCTGACGTCCAAAGTAGGCCTGATTATTCTATCATGATCTGGTACTGTATTGAATCATTTC
CAGTCACCTTTGTTACTTTGTCTGTATAACTGTACAACCTTGGCCACATGCTGCATGTGTATTCTTGG
ATGTGACCTCATTTCCGCCCTAGGCACCTCATGGACATGGTGTGTGTGTCATCTGAGCGTATTCAA
TGGGCATTGTGTGAGTATTTGACGGATCATCTCTGACCCCGTTCCTGGTCATACTCTCGTTTATTC
TGTCATACATGAACATGCAGAGGGCGAAAACCTGTATTGGCATGAACACATTTATCTCGTCTTCAGTC
TTGAAACATAAAAACCGTGTGTGCGCCTGGTGTGACTAAGTGTACCAGAGGTGCCCGCCATTGGAG
GGGGGGGGGGGACAAAAGGGCTATATCCCCCTGTGAGTTAGCCTTAGCCACTCCGTAGGGGATATAT
ATATATATATATATATAGTAGAAGTTGGTTTTGAAATAAAAACAACCTTAGAATGTTCTTCAGTCCATAAG
TAAACTTTCCGGCGTGTTCGCCTCTTCAGATGGACATTTATTAACCTGACCAGTGTATAGACGTCATTAA
TTGTGACGTCACAATAGTGACGACGTCATATGACAAAATCAGTAACGACATTAGGACAAAATGCCGATA
ATACAATTATGTCATTGTAAATTGAAACAATATGTACATATTATACATTAATATGTAAACTGTAACCTT
CAGTACACATGTGAATCATTATATAACGTTTCATATTGTACACATAATGAGTAAAGCCACAAAATAGATT
TATTTTGTAAACAACATTCATTATAAACATACATGCATCTGTTTCGCATTCACTGAAGGGTTATACATC
TCTATTAATCTGCTCTCTTTTGTTTTACGGAGTGTGGAATCATCGATAAATATTTTCAATAACGGCAT
TACTTTAAACTTACCTCCACCACATTCATCGATGTGCTCACTGACAGGTATACATCTGTTTTGGGGAT
TAGCAATTTGTGAGCGATGAAGGTTTCATCCGAACATTTAATTTAAGTTCTGTTTCCCCGATATATTTT
TCACCACATCCCTGACAGATCATCATGTAAATAACATTTTTGGTTTTTGAATTCATGTTACATTTTAT
TGCATGTTTTTGGGTGGGGTTAATTTCAAATTCATTGCCTTCTATGAGGTCCGGGACATAGCTTACATC
TCTTGTCCCCACATTTTGATACAGACGGAGTGGTAATGTTCTTCGTTAATTTGGAGACGTTAGAATAC
ATAATGGACATCCATGCTGAGAATATAGAGAGAAAATGTCAGAACGTTGATGATTCCATGGAGTGTGAG
ATCAGTAAAGTAGCGGAACAAAACATTCGTCAAGAACTCGAGAGCCTTTGGAAGAAAAGATTGTTTCAGC
AGACATGTTCTTAAATGAAGAGAGGTGGCGAAAACCTAAACTTGAGTGGCTGAACAACCTATGGTTCTA
AATATGGATCTAGTGTATATAAAGAATACAAAAGGGCCGTTGCACCTAAATCAAAGATATCAGCCCAA
ACTGACGTTAGGAAACAAAGTTTTGCAGAGGTCGTGATATCAACGAAGAAGCCACGTGTGGAATCAAG
TGTTAAACGTCCTGCAGAAAACAAGGAAGGATGTAAGACCTGTCCAAAAATTTAACAGGACCAAACACC
CACACAGAACTGTAGTGTCTAATCATGTACCCAAGGAACACAATACAACCTACATTGGACAATCCTAC
AGAAAGAATTTTTTAGGACAAAACCCGGCACCAATACATATGGAGGAAGGTTCTTCGAAGAAAATGG
AGACCACGCCAACAGGTGTCCGGTTTTCCGGAAGAGAACGGAGAGACAGAAAACAGAGGAGGAAACCAAC
AAAGAGGAAGAAAAAACAGGATGTGAGATTTCAAAGTTCCTGGAAAACAAGGGAGAGACTATAACAA
GTAATGTTTCATGTGACACACAAAAGGGATGTACCAAAGAGGACCTCAAATCATTAAACATTTCTAAC
TACGAACTGAATGAACATGAAATCAGACTCTTAAAAGAGGTTTTAAATTTACACCTACACCAATCCA
AAATGAGTCTTTACTTAAAAGCGAGGTAAGTGAATTCGTGCGCAAAGTACGACTAAAAGAATCTTTCG
CAGATGTATCAGAGGATTCTGATGCAACCTCTCAAACCTATAGGTGTTTGTAGCATAGTAAAGGGCAAA
TCCAATTTCAACCTTGGCAAAAATAGAAATGTACATCTTGACGAATTTGTGGACACAGTGAATAGTCA
GTGTATTCTACTGACAAGGATGTTACGTCTAACGTTTTCAAAGCTAGAACATAAAGCCATAAGATCTT
TGAAAGAAAATGATCAAATAATTATTAAGGAAGCTGACAAAGGAGGTAGCATCGTTGTAATGGACAAA
GAATCTACTATGAAAAAATGTCACGTATGCTTAATGACAAGGAATATTATGATAGATGCCAAGTTGA
TACAGAGAAGAAAATATTGAATAGGGTGCAGAACTTATCAGTACACACCGTACAGAACTGACTACAG
GGGAGTTAAAATACCTTACTAAGGCAGATACTGTTACGGCACAGTTTTATGGGCTCCCTAAAATCCAC
AAAAGTAAAGATATACAGCAGGAAATTGATAATCAAGACGAAGAGTACATAAAAGTAGATTTCAGTCAA
TAACTTGCTCTTCAGGCCGATTGTTGGAGGGCCTAACAGCCCGACTCAACATTTAAGTGAATTTCTAG

AGTAACGTTAATATTTGTTGTTAAAATATGTTGTACATTGTACTTCTACATAAGGGAGTGACCATTGG
ATTTTTATGCGAGGAGGAGAGATTTTGGAGAAAATAAAATTATTAATGGCATAGATACATTTTTTTTA
CAATTTTTAAGTTTTAGTTTATAATTATGAAATGTATCATGAATTATTTTTGCGCCACAAACATTCC
CATTGACCTTAAATCACAGTGGCGGATTGAGGGCGTCCCGCATTAAACCAAATTCAGTGAAGACGGGC
AATTATGTGGCATTATTTGGACCAATTGCAAAGTTCATTTTAACCCCAACCGATTGAGATACATGTGC
CTGCCAGCATTCTCTTCAAACCAAAAATTGATGGGAGAATGCCCTCGGTCTCCCTACAACCTTTAA
TTCATCTCTGGACTTCACTACTGCAGTAATGGTTGATTTTTGTCTCAGAAGGGGAATAGGGGCTCTCC
CTCACTACTTAAGGGCTGAAACACCTCCAATATCTTCACTAGAAATCGCTCAGAAAGCCTCTCCGACG
ATCTAGAACCCTTAAAGCTTCCGGGCCCAAGGCGGCACCTGGACTCTCCTCTGATGACCTTGGATCGT
CCCCCTTCTGCAATTGCTTTGGTCGATTGCGGTATTTGGACTAGTTGCAAAGCTCATTTTGACCCAA
GTAAAGGCAGGACAATGCGTCTAGAACTTCTGTAAATTACAATTTTCATGAACAGGATAGCCCCGAGC
CCTACAACACACCTAGATAGATAAATAGTTTATATTTATCCAGAAAAAGAGTGTCCAACACTATGAC
ACAAAAATAGTTTGAAGAGAAAAATCCCCCTCACCCAATAAATGAAATGTTTGCTCCCTAAAGTCTT
TTCAAGCTTCTGTTTCAAATGCTTTCATTGACGTTTTATGTAAACTCAAGAGTTTATCGTCTCT
GAAAATTTTACGTGGTTAATGTTGTTATGATAACTCAGATCAGTTAAACATGTAAATCATTATTAAG
TGAGTTAATAAAGCATTGGCGCCTTCGGACTGGCGGAGGGTGTGTGTGGAATAACACAATGCCCGAG
AGGGTTTAGCACATACGGGTCAAATTAGCTCCCTGAAGAAAAAGAAAGAACTCGAACAAATTTGCC
AGACGCTATTTAACAGACACGGGGGAAAAGAAAGGGGCACGTACGTCTATGAATACATGTGTACAAAA
ACACTCAATGCAGATTGCTAACTGAATGTTTAGCTTAATATTTCCCTGAAAACGATCTTAGTACTC
TTTGCTACAAGTGTACATATGAGGTGGTTCACGAAACCTTGCTCAAAGGTAGGGGCATTTAAATC
CGATTTTATGCTGTTATAATTTTCATGTTGTCAGTACTTTTGACAAGACACGAAACAATTTTCAAGA
AATGAGAACATTGGAGAGTCATATCAGTCTTCAATATCTGCACGTTGATTGTTTTTGGTACACTTATA
TTCATATCGACTCCCCACCTTTTTTTCCACCTCTTCCCCCTGTGTCTGGCAAATAATAATAATGATAC
AAGTGTCTCGCAAATACTGATATAAGTGTCTGGCAAATAATGATATAAAGCTGATATGCAGAAGCACC
CATGCACAAATTACACACAAAAAACCCAGATGCAAACCTCAGTAGCATAAAGTGGCAAAGATTGCATAA
AGACTCATCTGCTAAACCACTGTGTGCTTTGGACATCAACTATCCAGTGACATTCAATTGTGGTGCTC
CCACCAACGTCATAAAGGGCGACAATCCAACACGACATGCTGTCAAATAGACGACTGATATCTTGGGG
ACCTACAACATTCCAATTCGTACAAAAGATGTGTTTAGGTTAACGATATGTGCCGGGGTGGGGTCAG
TCTTCCCTAATGGACGACACAGGTGATCCAGATACTCAGTCGTACACAGTGTAGAAATTTGTGCT
TGTAAGAGTAGCCTTTCAAGGCCCTGCCAGACCAAGAAATCGTATCCTGTTCTTGCCCGAAGTGGTCCG
AATATTGCCATCCTGTAGCTAAAGGTTATTGCTAGAGACACGGCGAGCCGTGCATGTGACTTGATGAA
CCTATTTACCTGGGTGGCTCCCATCTCTGAACCACTCATTAGCACAGAGGATTTCCCTATATCTACAT
CAATCCCAAGCTCAAATCCAACATCTTTTGCATCTTTAAAATAACTATGAAACATCCTGCTCTGGTCA
TGGGTCTTGACACGCTTGACCAGACAATCATCAGACATTGTATTATGCGAGCCTTGGCGAGCATAATA
CATAGTGTATTATCCTAAAGCAGGATATCGATAATCTGTAAACACACGAGGGTATACCTCTTTATGAC
ACAATTTAATTCTTATTTTTTATCAAGAAAAACCCTATTTACAACCTTCCCGTACCTTACCTGACGAAT
ATCGAAAAATATCTGTTGGCTTTATCCTGTGGAGAAACCACCACATTGTATGATAAAAAATAAATATGT
GCAAAAGTACACACAAGCTTAATATTCTATCAAACCGCGTCCCCCAATATTGATTGGCAAAGTATAAAC
GATTAAGAGAGAAACGTGGGTGGTGGGCCCTATTGTCTGAAATGATTCTTCTTGTCAAGCGACCAAGA
CACTGAATTTTCGCTTTTGTCCAGTCGACCACACCAAAAGAGTATGATAGAACTGGAACCTGCGTATGT
GTTTGTGGCTTTTACTTTGTTTCGAGCGTTTCAGTTCCGAGCTCCAACCCCTTTTTAAACGACACTTGT
ACTCGGCTGTCAGTCTGTTCTTAATGTGAGCATTCTGGAGCCGATCTCTCACCTGCATTCCTAAGTAC
GTATACGGTTGGCCTTTAACTGAATGTTTAACTAATCCCCCTCTTGTAAATACTATAAACGGATCCAT
CACCACCGTCTTGAACAATTCCACCTTTTAGATGTAACGTAGCGTACTTGTGAGTCCAAATGATATA
CTGATATCCCTTGAAAAGGACTCGACAAAGAAAACAAGATGTTTCAAATTGTCTTCTCCTTTGGCGAT
AAGTTTAAAGATCATCCATGTACAAAATATGAGTAAGGGGGAGGACATGGATGATATTCCCTCCTCCCTG
TTGAGCAAAGAGAAAAGAAATGGGCTAAATGAGTCACCTTGAACGATTCCCTCCTTCGATTGGAATGGA
TCCCGAAGTCGTCACCTTTCCCTTGGCAATACATCTCAAGTTGAGTTGACCAGCAACCCATTCAGACTT
TAGTAAAAATATGAATCGTTCCGGGAAGGCCTATACACTGCAGCGACAGCGCCAGATACAGAATCATAA
GTTTTTCTGTAGTCTATCAAGCACAAAGAGAGGTTACGATGAAGTGTCTCACCTCTTCTGGCAAATG
AGATTGAAGTTGATTTGGGATGTGGTCACTATAGTCGGTCACCCATGACTCCTCAAGGTTACAGTTA
CCGGGTATAGAGCACAACCTGTTCCAGACCCCTTTCCGTTGGATGTCATGGATTGCTTTTCTGTATGAT
TTACGTAAGCTTGGTTGGGCTGTCTGTAGAAACGCTTTTCATGAGAAGAAAACAGTTTATTTTGATTA
ATTTGTTACGTTTCTCCATTTCTGTTTTAGTCCACATCTTGAGCTTTGCTTTAATTGAGTCCAAAAC
AAAGCGAAGAATCTTTTGTTTTTTGGCCTTGATTTGGACTTCAACCAATTCCAGATAGATTTTTGTT
TCTTAGACATTGGGGTTCCAGATGCCTAAGCTTAAAGGCAAACTCTAACCATGAAATACATTTTCAA
GTTTCTTGATTTGTTTAGGAAACGATTTGGTTTGTCTCTTTTATCTCGCTCAAACAGGTCTTGG

GTCTCATGTAGCTCTTTAAGAGTCCTTACTGCAGCATATATACAACAGTTTACGGCGAATAGCGAAGT
 GTCCATGTCCAAATGTAAAGAAATAATTTAATTTAATTTCAAGCTTTGGATATTTTCGTTAGAGATGAC
 TTTAACACAGGGCATTCTCAGTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAT
 TATTATATTGCTGTTGTAG**AGAACCTGGTCAGAAAGAGTGTGGAGCATCTGACTCAGGAAGAGACCC**
TGGACCTGCAGGCTGCCCTGCGTGAGCTGCAGATGGACTCATCCAGCATTGGTTTTCCAGAAAATAGCT
GCTGCTCATGGCGCGCCCGCATCTTGTGTGCATAAGGACACTTCTATAGCTTGTGTATTTCACGGCAT
GCCTACTTTCCCGCACTGGCACAGGGCGTACGTAGTTCACATGGAGCGAGCTCTGCAGACGAAGAGGC
GTACTTCTGGGATGCCATACTGGGACTGGACAGAACCCATCACCCAGTTGCCCTCTCTCGCTGCGGAC
CCTGTTTACATCGATTCCCAGGGCGGAAAGGTAAGTAAACAAGGATTAATGTCACTGCCTTACTCC
 AAAGGAGTTAGACGACAAGAAAATCGACTGCATAGTTCAATGTAGATGTTTCAAATAATTCATAAATT
 GCTATTACCCATTTAGAGTCCCAGGAGATTTGCCATTAGTCCGACAGGCTATTAGTCTGCCATAAAA
 TTGGATTAACTCTAAGACTTTTCGGGACTGCAACCCAGAGGCCACCTGCCATCTGGAGGCCTCCAGAGA
 TAAAGTGAAGTGTTTTTTTTGTTCCTTTGAAAATATCACTGGGGATCTCAAAGTACTCGTAGCCAAG
 GGGCCTCCGGAAATGTTTACCATTGAAAATAAATGTTACCTGGGGCCTCAAATACTCAAATAACC
 GGGGGGGGGGAGGCTACAAAATCTGAATCCGGCCCTTGTGGACAATGCAGTGTACTGTAAGATTCA
 GTGCAGTGTGGTAAGATTACCGCTATAGGAGATTTAAGATTAAGTGTGCAGTTAGGACAAGGTAG
 GATGAGAGATGTGGCTAGATTACGGATTAGACCAATGGGATGTCGGGCCAACTGGCTGTCAGACTAAT
 TACTGTGGGACTATCAAACCCATTCCTGCAGGGGTTATCGGTGATAGAAAACGAAATTACCATTCA
 GAGAAATGAAATTCATCAGTTAACCATAACCCTATAGTTTCAAGGGTGGCGCTAGACATACCCCGAC
 GAGGGATACGGCGCTCTGATCCCCGATAGGAGGGGGAGGGTTAAAGAGGGCAACGCCAAATACGCAAT
 TTGTTTCCGAAATCTTCTGAATGAATTTTACCCTCGGTGGGGGGGGGGGACAAATGTCCCCGAAGA
 TATATCTTTTCTTTGATAAATGAATGAATTTTACCAGAAAGAGAACAGTTGTGTCTTTACCTGGATG
 CATATTACCTCTCTAGAAAGTAATAAGGAATCTCTGAAGCATTGCCATAGTTACGTGTTCCATAAGC
 TAGAATCACTGGCTGCTATTCCATTTGACTTGTGGATGTCTTATTTTAG**GCTCACACCAACTACTGG**
TACAGAGGGAACATTGACTTTCTAGACAAGAAAACCAATCGTGCGGTGACGACCGTCTTTTTGAGAA
GGTGAAGCCAGGCCAGCACACCCATCTTATGGAGAGTGTGGTGGACGCACTGGAGCAGGATGAATTCA
CAATAAATTTTCCAATGTCATTCCAAAGAATTTGAAGAATTC

Abb. 43: Die zusammengeführten KLH1-Gensequenzen der Klone „Klon K1/1/1A“, „MP 35“ und „KLH1/2c“ umfassen die Genregion vom Intron S1/2 bis in die FU-a. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, rot: Signalsequenz 2, orange: Exon a1, grün: Teilsequenz des Exons a2.

4.1.2 KLH2

GAATTCGAAATACTGAAGTAGATTTAAAACAATTCGAATTTCTCATTGTAGGAACAATCAGAAGTTT
 ACTTTTAGTAAAATGGTGTATCTTAATGATGATAGCACATAAAAAATAAAATCTGACATTCTGAGA
 GCTTAGTTTTGATATATAAAAAACATAACTAAAGCTCATTAAGTTCCAAAATGATTGAGTTCTTATC
 CTCATTCAATGTATTTTGCATATGTTTAATACAAATTGTCCATATTGAATTTGGTTTTGCATTTTGT
 ATTCCACCAATGTGACATGTTTAGAAAGGCCATATGTTTTATTTGAAATCGACTGGTACATTTCTC
 GTAAGTAGTTCCATCTTAGTAAAATGCGTTTTAAAGACTGACCAAGTAAAACAGTGCTTCACACCATGT
 ATACAACAATCATCCTCAAAAAGAAAACACCAGTTGACACCATATTACGTATCATCAGACTGAAAGA
 TGTCGGTTGAGGCCTTGACCTTTGGTTTTGCATTATGCATATTATATCATAGCGTTGGTCCACTCTG
 TTCTCTGCATAGACCCATTCATGTTGATAAGAAAGTAGAGCAGTCTTAAGTAACTGATGAATGTGCA
 TAATTTGGAGCAGTTGCATGTTGACAGCAATGGGTGGACGAGTTCGATGCTTCAAGTTAATCTCAAAC
 ATTTGGGAGTCATGTCGATTACAAAATTTGTTTCCGATTTATAACAAAAATACATGAAAATGGCGCTG
 TAATAGTTTACCAGTCGTTTCGCTAAGAGTGCCATTCATAACAGTCATTGATGAATCCTCCCTTCCC
 CCCTATTACCCTTTATGTCATCGTCCGGCTATCTCGTTTCAATGAAAGATAATCAGAG**TATAAA**GTAT
 CGGCGTAGTCTTGCCAGCAT**ATCACCAGCCATCTGGTTTGATCATGTGGACCATCTTGGCTCTCTCT**
CACGGCGACCCTCTTGTTTGAGGTATGCATTTTCTCTTTTACAGCATTAAAGAAAGTATTCACGTTCA
 TGTCATGTAATCTCAGTTTTTCAAGTATTTTTTAGCATTTTTTGTATTTTTGAAGACAATTAAGTTT
 CATTTTGCATTCGAAGCATCATTATAGAAAAAATTGACTTAAAGTTACCATTAATATTATAGTCAAA
 AATATGATGTATATGATTAAACATATTTGCTTTAATGCTAATACTGTTCAAAGAAAGAAACACAAAAT
 GGGTATTTTTGTTTCATGGAAATCAGATAGGTGGCATATGATAGCGGTGCAAAATTTCCAAACTCTCAT

AATGACTTAAACGCAATCACAAGAAAATGCAGATGAAAAACGTATACATTCCCACAAACGCAGGCTCG
 AGCAATGCATTGAATCAATAGATGTGCATGTTCTGCACGTGCATCATGTTTCGCCAAGGGTGAGCTTGA
 ATGGCTTGTTCCGGGCGCTCGGAGTACTACGACCAGCAATCGAGCGGGTTGAAACACTGTTTCAGAACA
 TGTTCTGGCTGTTCCAAAGAAAAGGCTGGAGTAGTTGGATCTGTGACGTTATAAACATGGCGGATCTT
 TCTGATCGAGTCGACCCGTACAAAGTTATGCTTAATGACATGTTTAGTTAAATGGTAAAGATCTTTGC
 GCTACATGTTTGATTGGGAGGCTTACAGTATATACAGACTGGAAGGTGCTATTTTCGTGTCATTTTAGT
 TTATTCAGAAGACATGATAAACATGATAAATATGAAACTGATATTATCAGATGTGACACCGTAGTCC
 CTGTGTATCTAGCAATGGAGCTTTAGGACGCGGGCAATCATGTCTGAATGTGAGAAATGCTTCTCATT
 GTTTGTTTTTTCGTCCAAACATAATGGAGCCCTGTAGAGGAGGTACATGTATATGGTTTGGGTAGATTT
 AAAGTTTTATTTTGCGAAAAGCTAAGCTTGTTCGCCAATATGAAATGTCATACACTCCGCTCCAATT
 GCTGGGATGCAAGTGTTCAGATTACTGTTCCAAATATGTTTCAGAGTTGAGCATTTCGAACACCCGCTA
 ATTGTAAACCTACTGTGGCACTGCAACAATACGTCAAGACTGATTGTCACGTAGAGGGACACCGCAAT
 CGACCGATTGGAAGCGAGCACATTTAAGTTGTGTCGTTGCCATGGCGTTTAATGTGTCGTAAAGA
 ACTATCAAGACTGTGGAGCCGATACCAACAACATAGGTTCGACACCGCATCTTTCCAGATCGGGTAGACAC
 TACGTGACTACGTCTGGCCAGGACCGTTACATCCGGGTATGTCATCTATGACAACGAGCGACTAAGGC
 AACCTCAATCGTAAACAACAATACCGGGGTTTGGACATCGAATCAGACCATGCTCCTCTGCCAATGAGT
 GAAACAGACCTTCGAGTCAGTATCATTATGACTCAGCAACTACCACTTCAATCGTGCCAGGTGCATAG
 AGTATGGCCTCAAGTGGGATCGAGACGTGTTTGATTGAGTGACAAATTGCCATTTATACGACGTGGAA
 GATGGATTCATGTGTAGCCTAAAGATTGAGAAATAGAAAATAAGAATAGAGATTTATAGAGCGCCCTA
 ATCCACAAAAAAGTTGCTCAAAGGAGCTTGTCCATAAACAGTAGATCCATTCACAGGGAGTGATGTTT
 CTAAAAGAGGGGGTGGGTGGTCAGCATTGTTTAAAGCTGTTAACACTCATGGGTATATCTCGCAAT
 CTGCAAGGCAGTGTATTCCAGAGATGAGGGGCTGAATATTGAAATGTCTACCTTACATAGCTGTTAGG
 TCTAAATCTTGGCACTGCTAGTCTATTCTCTGTGTGGGAGCGTGGTCACCCGGCAGGCTGACCAAGTC
 CTTTTAATGATTTGAATGACAGCAACATAATCTTAAAGCCGTGATGAACGTTTTGCCACAAACTGTG
 TTCTAAGCATTGTCAGGGTAGAACAACAGCACTCCGCTATGGTATCGAATCCTGCATTTCCGGGCAGC
 ACAAGCAGGGGACATGTCCGGGAACCTTAGGGAATCTTCCACCCCTGTCCGGGAAAAATATAGCAAT
 TCGTTATTTAAAAATGTGTGTATTTGTCCGGGACCTCAGCCCCAAGTCGGGGAATTC

Abb. 44: Klon „KLH2-2/3b-4“ umfasst die Gensequenzen von der Promotorregion bis ins Intron S1/2.
 Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, lila: Promorteilsequenz inklusive TATA-Box (fett), blau:
 5'UTR, rot: Signalsequenz 1.

4.2 Sequenzen des *Haliotis tuberculata*-Hämocyanins (HtH)

4.2.1 HtH1

ACTCCCTTGTACCAGGCGTAATGTGGCTTGTTCAGTTTCTACTCGTCGCCCTTGTGGCGGGGGCTGGA
 GCAGACAACGTCGTCAGAAAGGACGTGAGTCACCTCACAGATGACGAGGTGCAAGCTCTTCACGGCGC
 CCTCCATGACGTCAGTGCATCTACAGGGCCTCTGAGTTTTCGAAGACATAACATCTTACCATGCCGCAC
 CAGCGTCGTGTGACTACAAGGGACGGAAGATCGCCTGTGTGTCCACGGTATGCCAGTTTCCCCTTC
 TGGCACAGGGCATATGTCGTCCAAGCCGAGCGGGCACTGTTGTCCAAACGG

Abb. 45: Klon „HtH1/5” umfasst die cDNA Sequenz von der 5’UTR bis in die FU-a. Blau: 5’UTR, rot: Signalsequenz, orange: Teilsequenz der FU-a.

4.2.2 HtH2

ACTACTGGATTGATCATGTGGACGATCGTGGCGTTGTTATTGACCCCTCTTCTCTGTAGGGGGTTCA
 GTCTTCAGTCGACACCGTCATCAGGAAAAATGTGGACAACTTGACGACAGATGAGCTCCAGGCCCTAG
 AGGAAGCCATGCATGACATCCAACAGGATGAGAGTGACTTGGGGTACCAGGCCATCGCCGCCCTACCAC
 GGAGCGCCAGCAGGATGTGTTGACGGTCACGGCCGCAAGGTGGCGTGTGTTCTTCACGGCATGCCTTC
 GTTTCCCTTGTGGCATCGTCTTTACGTCGTGCAGCTGGAGCGTGTATGATGAGGCACAAGTCCACCG
 TCAGCATCCCGTACTGGGACTGGACACAGCATC

Abb. 46: Klon „HtH2/5’-a” umfasst die cDNA Sequenz von der 5’UTR bis in die FU-a. Blau: 5’UTR, rot: Signalsequenz, orange: Teilsequenz der FU-a.

CGACGGCCCCGGCTGGTATCACATTCAAATACGAAGTGTATTTACACATAACAATAATAATATATGTT
 GCAAAATCACGTGCGAATGAACCGCTGCCCTTTAAAAAGATAGAATAACCCAAGTGTGTTAGTCACA
 TGACGAGGGATTACTATAAAAGACTGTATCTCAGGGGTCAGCGTCATCACCAGACACTACTGGATTGA
 TCATGTGGACGATCGTGGCGTTGTTATTG

Abb. 47: Klon „HtH2 Promotor N1” umfasst die Gensequenzen von der Promotorregion bis zur Signalsequenz 1. Lila: Promotorteilsequenz inklusive TATA-Box (fett), blau: 5’UTR, rot: Signalsequenz 1.

CTACTGGATTGATCATGTGGACGATCGTGGCGTTGTTATTGACCCCTCTCTGTAGGTAAGTCGT
 TATTGTCTATCTTAGTTTGGCGTTCTATCGGGCACAGACGCTTTCTCAAGAATTACCTACCCTGATCG
 TGTCAGGAACTAGCTCGCATTTTATATTCTTCTGAATACATTCGAATTCACGAGCACTACAATCCCC
 ATCCCGAGAGGGGGGGCGGGATAGATCAGGTGGTAGAGCTTCGGCCTTCAGCTTCTAGTCACCCCGCT
 GGAGTGCGCTGGCTGAAGGTCCCGAGTTCGAATCCCGCGGGCGACAGGCAATATCTCCGAAGGAGAGA
 ACAGTTCTTCAGTCGGTGAATTTGGGGTGCAATGTTGTAAGTACTGCTGAATTGCGTGCAACACCACCTTG
 GTCCCTCAGATAACCAGCCTTGCCGCGCTGGTCTTACTACATAGCAGTACCACACAGCAGTAAATCTGG
 CCATATAGCTGGGATATTGCTGAGTGCACGTTACGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTA
 GTAGTAGTAGTAGTACCATGTATGAACATTCATGGAAAACTGCCTCGGTAAGTAGAACCAAATCGGT
 CTCCGATAAGTTAATTAACAATTTATTAACAATTAATAAATGCTTATTATGCTGTGATTGCATTTCA
 GGGGTTTCAGTCTTCAGTCGTAAGTATCATATTGACGTGCTGACACATTTAGTGATTACTGATGTTT
 TCGTGAACCATGGGTTGTAAAGGTAGAGTGACATAACCCACGTTATTGAGGACTGTCGCGCTCAGTTTC
 CTCGCGGTTGGTAAAAGATTGCCGATAGACACATAAAACCATCACCTCCTGTTAGTGACCTCGACCGT
 CACAAACACCAATGTTTCAGGAGAAAGTACGTGCGAATGACATTCTTACATATTTGAAATTTTCATGTC
 TGGAGCAACTGTAAACTTTCTCAAATCGGTATGAACATTTTGTACAAGTCTTGTCTGACACTGACTT

CATTCTGATAGGTTCTGGAATTATGGAATCTTCGAGTACTGGAGTATTAACGAAATGTGAAGAACAGC
 TGTCTTCACAGAACTTCAAGAGATCACTTGACATGATACGTGTCCTTACATTCTTATTTTCAGTAGAAA
 ATAACTCTTCAAATACAGAGGTCCTTCCCTATAAAGTAATGTGTATCTTTACTTGTGCATGTGATATA
 TTAAGAACAAACATGGAAATAAAAACGCTCGAATTTTAATTAATCAAACATTAATCAAAGTTTAAAG
 ATCTATGTGAGGACACCAATGGCCCTTTTGTGAGCGCTGTGTTGATGAAGCGTGACATATACATTA
 GTTTTCTAGTTGATTTTAATAGTAGCATATCTTTTTTATTTAATGTGATGACTAGATTTTACCATGTA
 CAATCGCCTGCATCAGAAAGTTATTATATACATCGAGCTAGGGTCCATGCAGGTAGCAAACCTACTCC
 ATGTCTTCATTGTCCCTAGTATGGTGTCAACCTCAGTTGCTGGTGTGATCTGTAGCCCATGTTTAAAGT
 CGTAATGTTATTTGAAGTTAAATTTCTAGTTTTTAATATCTAACTGTGAGAACTAGTTGTTTTACTGT
 CCTTTGAAGACAGCTCTTAAAAATAAACATACTCTTTTCAAATGTCTTCTCGTCACGTTATGGCTGA
 AATATTTTCAGATGTGACGTTAATTATTGAATCACTCCCTCACTCAGACAAAAGTTGAAGGCCAAGAAG
 ATGCACGACTAACAATGCAAAGAAAACCGTCGCTGTTGTCTACTTAGCACTCCTTCCCAAGAGCTCGC
 GAGTGAGTGAGTTTAGTTTTACGCCGCTTTTAGCAATATTCAGCAAATCACGGGCGGGGCACACC
 AGAAATGGTCTTCACACATTGTACCCGGGTCTTCGGCGTGACGAGCGAACGTTTTAACCAGCAAGGTCA
 TCCCACCGCCCTTAACTCGCGAGAGCACACGCAGCCGTTATTGTCCATTTCGCGACAGACTTCACT
 GCTATGTTGAAACAACTATTGCAAGGAACGTTCTATAGACGGCTCAGTCGCTGGAGGCCCGTAAT
 TCCCTGTACAGAGTTGCGTCCCTTCAGCACAAAAGAACTTATGATTTAGGCTTCGAACCAGGCTGGT
 CTAAAGGTTCTGTTTAAAGGCTTGTGAGCACTTTACCCGTCCTCCTAATGTTGAACATCTGAAATTTG
 ACTTCGGGCTTTCTCCTACATTACTCTATGTACAATATTAACCTGAGTAATAGCTGTTGTGTCTGAT
 ATTTCCAG**ACACCGTFCATCAGGAAAATGTGGACAACCTTGACGACAGATGAGCTCCAGGCCCTAGAGG**
AAGCCACGCATGACATCCAACAGGATGAGAGTGACATGGGGTACCAGGCCATCGCCGCCTACCACGGA
GCACCAGCAGGATGTGTTGACGGTCACGGCCGAAGGTGGCGTGTGTTGCTTCACGGCATGCCTTCGTT
TCCCTTGTGGCATCGTCTTTACGTCGTGCAGCTGGAGCGTGCTATGATGAGGCACAAGTCCACCGTCA
GCATCCCGTACTGGGACTGGACACAGCATC

Abb. 48: Klon „Hth2/9“ umfasst die Gensequenzen von der 5'UTR bis in die FU-a. Schwarz und kursiv:
 Intronsequenzen, blau: 5'UTR, rot: Signalsequenz 1 und 2, orange: Teilsequenz des Exons a1.

4.3 Sequenzen des *Aplysia californica*-Hämocyanins (AcH)

4.3.1 AcH1-Sequenzen aus der Gendatenbank

TTGAGTCATGTGGTGGATTCCCTCTATCTTTCTGTGTCTCTGCCTTTATCTATATCAACGTCTCCTTCT
 CTTTCTGTTTCTCTGTCTCTGTTTCTGTTTCTGTCTGTCTAGCTTCTGGTCTCCCTCATAAATCAA
 TAAAGTTTATCTTATCGATCTTAATTGTCTGTCTGTCTGTCTGTTTGTCTGTCTGTCTGTCTGT
 GTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGGCTATATCCCTCTCTTAC
 TCTTGTCTCTTTTCTCTTCAATTGAATCTTCTTTTCTCTTTTCTCAGAGTTGCCATCCACTTCCATT
 ATTTTCTATCAAGAAATCAGAAGAATAAATAAGCTGAAATGATTCCAGAAAAGCTTGTTTACATTGTC
 ATCCCTAGCAGCAGTCGTAATGAGACAGACAATCTGCAAGATAAAAACAAGAAAAGTGCAGAACAAAC
 AAGCAAAAACCCATCTAGCTGATCAACGAGCTGGGCCAGACAGAATGGTAAACAAAATTTCTATAACG
 CTAAGAGCATGACTTTTTGTGGTAATAATATGACTAACAACGAGAGCATGCTGTTTCTCTTTCAAATG
 ACTCGCGATCATTGTTTGAAGAAACCATTGTGTTGTTGCTTTGGCTGCATCGTTATCACAAAGGA
 TAGGACCTTCAACCGGCTGGAAAAAAGTAAAACAAAACAAAACAACCGAACATAACAAAAGAACAACGTG
 CATAGATAGAACTTTTTAGAAAAGAAACCATAACGAGAGATTATATAACACTCATTACGATTCTTCT
 CGTGGTTGCAACCCTTTGGTGCAACTGCAGGGGGCAAAGGTATTGGGAAGATATTTTAAAGCTCCAT
 TTTAAACCTCAAAGTCAAACAATAATTACAATATTTGGTAAATATATAAGAAATTACCCGTAGATCAG
 TTTTCGAAAACACCTGTTTCGCGATAACAAGTTCTTTTATTTCGCTTCTGTTTACAACCTCTCTTCTGCT
 TCAAAGTAGACTACCCATTGTTATTTGTCCCGTGCATCTATCGTCTTAACTTCCCTACCTACCCCC
 TTCCACACCCCTTTCCACACCCACCCATTCCCCTCCACTCCACATTACCCCCACCCCTTAGGCCATCT
 CTCACATGTATAAAAGCCCGGGTCCCAGCCAGTCTTTA**CACCGCTGAGGTGCTCGAGACGTTCTGA**
ACGTGAACCACTGGTAGGTCCTCAAGATGGTGGGTTACCTGGGTCGAGCGCTGATGGCTTTGCTTCT
GGTGAGTCCATTTTCTGTTTGTAACTGTGTGTCTGATTGTTGGTCACTTTGCTTTTTTCTTTTTT
 AAAAGTTTCTAATTTCTCTGCCTCTCTTGGCCGTGAGGGGGGATTGAGTTCTCTATGGCAAGTCTCGG

TCTGTAGGTCTATCTGACGGATTGTTGTTTGGTCGTCTGCATGTTTAGAATTTTGCTGAGAGTCTAGC
AGCCAAAACATTCATATAAAATAAAAGTCACGTCCTGAGACACGTTCTTGTGACTGTATTTCACTGTTT
GTCGTTGACTGCTGGATCTGTATTTAATTCTTCAGCTTCTGTGTACCTAGCTAGCGTAATGACTGTAA
ATCTTCATCCTAGTCTGTAAGTCGCCCATGAGCTTATCTATAAGACGCTTATAATCGCGCTCTCGAGA
GTAAAAATGTTTCATAGCCGTGGAGACTCCAACCG.....AATG
GGCGCGGCCAGAGGATTTTTTCCCTCCCCTTCCCTTCGAGCCCCATTCTCTTCACTCCCCTGCCTTT
CCCTTGCTTCTATTACGATGTGGCAGTATCATCCAGCCGTCGCATGCGCCTCGGATCCTCGCCCCCG
CGTGTCTTAATTCCCGGGTTAAGAGTTTTGTGGGGGGGGCTGTGGGAATAATAGATGTTCTCTTTT
AATTTCACTCTCTAAAAATAAAATCCACAAAAAATTTCTGGGAGCGCACCTGTGTGCGCGCGCGTA
TGTGCCCGTGATGCCTTAAAGGTGGATTGGGTGGAGAAGCTCTTAAGAGATTCCTTAGACGTAAACCA
GCGTGCCCCAGGAGTGAGAGAAAGGTGAGCATATTTATTTTTTTGGTATAGTTGCAACCACACGTCTC
GCTACTCCTTCAGTGATCTTCTAGTACTTATAAAATGAGATATACGGGGGCTGTGGCAGCGGGTTTC
ACCTTTTACAATCATCTATACCTCACTCCCCGCACTCCTGTATATGTGTATAGGTGAGAAGCGGTCAA
ATAAGTAACCTGTCAGTCTCTGCCCGAAGCTATCGGAGGCTAGGTGACAATTATTCCTTTTTTGCCTA
TAGGGACCTCGACACCCCCCCCCACTCACTCAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTCTCTCTATCT
AACCTCTTGTTTTTTTTTGTCCATGGGGGGCCAGGAGAGGCGAAGGACTAAAGACATGTCCATGACG
TTCGAGTGTACAGTTCTCATCGACAGAAACAGTCTTTTTTAGCCTTACTGACGAGTTAGCACTCTTT
CAAAGTTCAGCCTTTTTTCTATACAGTCAAACCTGATCTAACAGCTATCTGTCCAAGACAATCACCAG
TACAAATGTCCACTTCCCAGTTCCCTTCTTTATTACAAACATCACAATGATAGTGTCCAAGACATCCA
CCTGTCTAAGACATTCACTTTTTCTCCTAGACAATGGATGACCGTCTTGGACAATTTTCATATCAGTCCA
AAATTAGTTTCATGCCTCATACAATATAAACATGATTCTTACCACAG**CTGGCTTTAAGCAACGCTGCC**
CTAGTGAGGAAAAGTGTGATCAGTTGACGTCTGAAGAAATTC**CAACCTTCAGAAGTCTCTTCGTGA**
AGTTAATGACGACACTTCCAACCTCGGCTATGCGGAATCGCTTCGTACCACGGCTATCCGACACAGT
GTAAAGATGGCGACCGTGATATAGCTTGTGTCTCCATGGCAGTCCAGTGTCCACAGTGGCACAGG
CTCTACGTGGTACAGATGGAACAGGCGCTCAAAGCCAAAGGTATGTACAATTAACATACAGTACTGT
ATGACTTTTGCTTATTAGAAGATGCTTTCACAGCAGTACGTATGGTATAGCTTTGCTTAGGCGTTAG
ATATAGAGAAAGTAGATTGCCCAAGTACTACTTCCCTTCCCTCAGACATCGACTTCTTTGATGTACTC
AAAAGTAGATGCATGATCATTACTTATGGCATCAAAGAATGTTGAAAGGCTGTCTTACTTTTTGGGTG
TATGGGGATATTTTTGGTCTGGAAATTTTTAAAAGTATTTTGTCTTACTCGTACACGGACTAAGT
CTATTGTCTGTACCTTCCATCACTACGATGCCACATACACACGGATCTCCGAGAATTTTTGTTCTTA
TCC.....CGGTCCCGGGGGACCCACGAGAGAAATTTAAAAGA
GGATGAAGAAGAAGTAGAACGAGTAGTGCGAGTGAAGAGAGCATTGTATTGCATCCCCTTGTAGAGA
GACATACGTTTTGTTTCTGTGTTATCTCCACGTATACAAAATGTAGAAAAAAGAGTGGTACAATATCA
TTATTTCCACAGCTCACGATGTTTGGCCTCCATACAACTTCTCGTTTTCTTCCCAG**GTCTGAGTATCG**
GTGTTCCGTACTGGGACTGGACTCGACCCCTCAACCATCTGCCGAGCTAGTGAGCCAACAGGTCTTC
ATCGACAGTGAGGGCGGGAAAGCCGGGGAAACGTCTGGTACCAGGGAGACATCAACATAGACGGTCA
AGTGGTTCACACGGCGAGAGCTGTGGACGACAGGCTCTTCCAGCAGGTGAGGAAGTTACATAAGTTAA
AGGGCAAATCGGCCTGTAATTAGCACGGAAAACCTGAGCGACAATTACATTCTCAAGAACAGCATGCA
CAAACCTGTATTTCTTAACCTTTGTGGAATGCTTCCCTCTTGACCTCGGTAGTCTTGGTGCCATAGTAAT
AATATATTCATCATGAGCGTATGATGACTTTTACCAACTTAGAAACGTGAGAAATTTCAATTGTTAGCC
ACCACAGGTAGACTTCAA.....CATGATGACTGATTTGCATTTA
GAAATGTAGCTGTTTTACACCTTCATCGACACAATTTAGAACATTTAGAAGGCGGATTTTCGACCCTAT
CTGTCAGGGCCAACCCTGGCTGAGAGGGATACAACATCCCAGCAGAAAGACCCAGACACTAGGTAAAA
ACTCTCCCCTCGCGAATCGATCTCCGGTCTTTTCGTGCAAGAGCTACACCACAGACGTCCGGTGACA
CGAATGTGAAATAAGCCAAAGAGTCTAGTAGGCTTTAACTCCACCAGCAGTAAAAGGCTTTAAAACG
CAATGAACATCTTACTTTCTAACTTAGACATGTGTGTGACTTGAAGAGACTAGGTAAATATCATAGTC
TTTTTCAGAACTCGAGCTGAGAAATATGTAGCTCATACTGCCATTGTGACCCAAATGTACTGAA
GGAGTTCAATAAAAGTGGTTAAAACATTATGATATCTTTCCATAG**GTGGCTCCTGGGGAAAATACC**
CAGTTGTTGAAAATGTTTCTGAACGCTCTCGAGTACGAGAACTACTGCCAGTTTGGAGTCCAGTTTGA
GGTGGCTCACAACACCATTCACTACCTGGTGGGAGGACGTACAAGTACTCCATGTCCCATCTAGAGT
ACACTTCTACGATCCCATCTTCTTCCCTGCACCAC**TCCAATGTGGACAGGATCCTGGCCGTAAAACCTT**
GCACTTCTTGGCCCCGGAGCACCCAGAGTAAAGTACAAACAAGCTGTGACCATTGCGTGAGGCAAGA
AGCAAAGTGAATAAGACGGAAATTTGAAATGGGAATTTTGTGTTTAAAGGAAATAACCTCATTTG
TGAATCCACTCATTGTTTTGCAATTAGTTGAGGTAGACACATTGTAAGTACTAGATATATGAACCCGAAAC
AACACACTGCATCGGTGTCAAGAAAGATGATGCCAAAAGACGCGAAACTACTACATCACTGGATAGA
CGTCACACTCCCCTTTGTTTTGTTTGTGACAACGTTGAAACAGGTGCCAATCTCTGCGGCTC.....

.....TCCGATGCGCAGTCGGAACACCACTCTCACTTCTGCAGGCTTTTCAG
AAAGGTCCCACGGTTCCAGCTTATTTTTGTAATACTTACGTAGTCATATCTCCGATACATTCAGACAG
CATGGGCACTTTAGGACCCAATGCAATCGGACTGAGCAGTTCAGTCAGCCTGGAAATCGACCCAGTGA
TTGTTATGATGTGCTGTGGTCAGTGATACTAATAGAAACACAAGTGCCCGTCTAAAATCGAAAACCAA
TAGTTTACCATCTGACATCTCATCGCATGAAAATGTCATCGAGTGACACTTGCTGCAGTGTCAGTTTT
AGTCTCACTTTTGGGACCTTGGATATTTCAACCGATTTCAATTTTTCTCTCGCTTTTGCCTCGAG
ATATTCGGAATTGCTTAACTCTTTGAGGACGTAGCAGTACATAATTATTATGTCTGACCAACAGAAG
ACCAAAGTTATGTTGCAGCACATTTTCGAGCTATCGTACACGCATAAGAAAAGACGAATATATGAACAT
ATTTCCTAGTATGCAGGTTGTAGCTGGCTTTATCAAGTTTCAGATACAGAAAACAGAAATTGCAAACGT
GTGTATGAATAAAAAAGTCATATCTCTTTTTAAAGTATCCCTCCCCCCCCACCCCCAAAAAAACCCAA
CAACAACAAAAACCAGCGAGTCTTCAAAGAGTTAACCTGCCGGTAGATGGACACGTTTACCCTTT
TCTGTTCTGAGTAAGGCTTATTATAGGTACAGACTTGCTTTTTACCCTTGGTATTTGAGAACGTTAAT
TTATGGCTTGGCTACAATATTTACTTACAG**AAGGAGGAGTCGAATTTCTGTGATCTGAAAAATTCCA**
TGACTCCCATGGCACCTTTTAGCTGGGACTCGAACCCCATTTGCTCTGACCCGCGACCCTCTTGCT
CCTCAGACACTGGCGCATTCCACCTTTGGCTACAGGTAAAGCGCGTGTATGAAGAAATGCTTCCTAT
GCTCACGCACCATTGATCGAATCCACCACAGTGCGATGAAG.....
...GTTTCATCGCACTGTGGTGGATTCCCTATTTTCGTGAATTTCTGTCTATAAATGTTGATAAAAGTGCA
GAATACATGTAGATCTAAAAGAAACATATATTTTTATAGAATTCGTTTTTCTGTTAGCTTACAACAGA
AAGAGAAACAAAAAGTAATACCTGCGGAGGTATGAAACAAATGGAATATACCCTGGTATTTAAGAG
ATATAATACCAAGCATAAATGAGCACTACCAGGTTTACAAAATTGATATGTAAGCCGAAGATTATA
TATTACAAGATGGTTCACAACCTGTATTTAAAACAAATGTACTTAATCCCCCCCCCCCCCCCCAAAA
AAAAACAACAACAACCAAAACAAATAAACAAAAACAAAAAACATAAAAAGCGTTTTGGAAAAAAGCAG
CAGGCCTAAATAATTCCAAATTTATTT**CAGCTACGACGATCTTTCCCTTGAACGGATATTCGGTGGAGG**
AGATCAGAGCACTTCTGAAGGAGAGACAAACGTACGACCCGCTTTTTGCCAACTTCCGTCTCTTCGGA
ATTGGAAGTTCCGCTAACGTCAGAGTGGAGGTATAAGTGTGTTGCTCTGGGCTTCGGGCTATAAATCGG
CATTTTTTCTCTGTCTGTTGCTGTCTCTCCCATCTCTCTCCCCCTCTCTCTCTGAGTCTGTCTCT
CTGTCTCTGTCACTTTCTCTCTTTGTCTATCCTTGTCTCTCTGTCTCTGTCTCTCGGTGTCTGTCTGT
CTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGT
CTCTCCCTCTCTTTCGTAAACACATAACAATGTATGCATACGTATGCATATGCGTATGGGTATATGT
AAGT
GT
CTTCTTGTCTTAGAATGGAACCACAGCGTCGAATGGCACAGAGTGGATTTAGGAGCACACATTTACA
CTTTCGCAGTTCTATGAACTTAAAGATCTATTCAAGTGTTTTTGTGGTTAATGCCTTTCTTTCCCTTG
AATAATGTATATAACTTTAACAACTGTTTTATTTAGAAAAGAGCCGACGTGTTATTTACTTAGTTGA
TCAAATTATAAACTAACTACTAATCGTAATCTTTCAG**GTTTGTGTGCCCTCCAGTGACAAACTGACTG**
GTGATTATTGTGAATTTGCCGGAGATTTCTTCACTTTGGGCGGTGCCATCGAGATGGCTTGGGCATT
ATATGGCCTTACTACTTCGAAATCACATAAGACGGTGCAAAATCTGGGTGTTGCTTTGGACGGTAAC
CAATGTCCAGGCGGTATCTTTCAGCGTCAACGGCACAGAACTGCCAGCAATCTCATCCCCAGCCCTT
CTGTGTCCTTCCAGGCCGCGAGTCGGCAAGACTGACCGTAAAGTGGCTTATTACTTAGTTGTGGATATTT
TACTTTGTACCGGTGTGCGCATGCGAACATGTATGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
TTTTGTGTTGTAATAGTGTGAATTTTTGTTTGTGTTGAGTGAATCCACCACAGTGCATGATTG.....
.....GAGAAGAGTTATTTTCCCTTCTTGATAAATAAAGAGGATCTGA
TAAAAAAAAGGTGGGGGGGGGGTAGAGGGGTAGAATGAAAGTGGGAACAGAAAGGGGCCGAGAAATG
GATGAGAACAGAAATCTTCCATTATTCTTGTATTTCACCTTCGTAGTTTCAAAGTGTGAAGCTGTTT
TCATTACAGTTACTGAGTCATGGTAATTATCAAAGAAACACGACCATGAATTGATTATTTTCAAGTTTT
TTACACGTACCGTAAACTTTTTGTATGTAATAAATACTTCTTGGTCTTGTATCACTCTTGCTCGTTA
CACCGTTGTTTTTATTACTGTTGTTATTGTTATTGTTTTGTTGTTGCTGCTGTTGTTGTTATTGTTGT
TGTTATTGTTATTGTTGTTATCGTCGCCGTTGTTGATATAGTTGTTGAAGTCACATTAACATTAGTAA
ATAATTCAGGATCAGCGCAGAGACTTGCAACTTTTGCTTTAACTTCGTTCCGCTTTCACCTTAAGCAAC
TTACATTTTATTTGTTTATTCAATTACCGTTCCACAG**CTCCCATGGCGCACGGCGAGTCAGAACACGGG**
CATGAGGTCCACGACGGGGTGTCCATCCGTAAAGACATCGACACTCTGACCAGGGAAGAGGTCAACGA
CCTTAGACAGGCCCTAACGAAGTTCCAGGTACGTATATTTCTAAACAACACTCATTTCAGCTTAGCTCA
GCGACAGCAGAGGAAACAAGAACAGCAGTAACAAAAGCAATAGCGTAAAGTCAGACCACAATTTTGAA
TTAAGAATTAACAAAAATTAATCTCAGCTCCCTAATCTGTATTATCTGTTGCATGTGTTCAAGAAAT
GTTTTGCCGAAATTCGAATTTTAAATTTTGAAAAAAAGCAAGAAAACATAACAAGACGTAGGAAAAAT
TGTCAAAAGAATGAAACAGTTCTTCTCTCTTATGCAAAATATGCTTTCTGGCTTGACACGAAATAAA
TATGAACAGCTTGGGAACAAGAAGCATCATGATTATCTCAACAACATCAGTAACGATAGGGTTTAGC

TTGTAGCAGTTCAAACTTTAATTGTCTCATAATGTGTACCTTCACTTAAACATAACCGATTGAACTAA
GGTGCATGTCTAAAGAGGAAAGCGAAGAGAAATCAAGATCCGGTTGTCCATCTGTCCCTCAG**AATGACC**
CCAGCGTGGACGGCTACCAGGCCATAGCAGAGTTCACGGAGACCCGGGCAAATGTCTTACCCCAAC
GCCAAGAACCGACTGGCCTGTTGTATCCACGGCATGCCACCTTCCCTCACTGGCACAGGCTCTTTGT
CGTACAGGTGAGAGAAATATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCAT
CATCA
TCATCATCATCATCATCATCGGGCTTCCCTCAGGAACATTACAGTATAAAATGACAAGAATCTAGATCT
ACACATAGTGTA AAAACGAAAGTGCGTACATACATGTCACAACACTTAAAGGAGCGGTGAGTACAAAT
CGCAAAGACCAGAGAGAAGGGAAACAAAGGCCAGAGAGGTGTATCTTTATAGGGAGTGGGCTTTGAT
GTCCCTTTTCCAAAATCAGTTTTATGATTTAAACCCAGACGTTCTCTACTAATTTTGTATGAGGAAATG
CCTTATGCATTCTGTGTTTTTCTGGATACAAAGGAAGACAGTTCTCTCATTTGTATAACCCATAGTCTA
TGTTTCCATATCAATCACGCGATTTGGGCTACAATCGAGAAGAACAACGCTCAAGTTAACAGACAC
ATAAGAAATCAGTTTACTGCTGTCAA AATTATGTACAGGCACATTCAACATGACTTTAAAATGCTAAA
TATTTAAAGA ACTTTGCTAAGTTTCAAACGTACAGGAACGTTTCCCAAACAACGGATATTGTAAGCGA
ATTGCGAAGGAATTATAAACTGCTTTTGAATTTTGCATGTGCAGTTTGAAGATTCAGTTCATGGGA
GAAAGACGTTAAGTCCCGATGTTCTTCTCTAAATATCTTTACAGTGTGCAAATCCTTACCTGAGC
AGTTTGAAGATTCAGTTTTGCGTGGAAAAGACATTAAATCTGAGTTCATCCTTTTAAAATATATTTA
CAATGTTGAAAACCTTACCTGGGCAGTTGGAAGATTCCGTTCCATGGGAGAAAGAGGTCCCTCCTCT
TAAATATACCTACGGTGTGCAAATCCTTTCAGTGTGGTTATTCTTTATACAATTATTTTATATAAA
ATTCATTTTTAG**GTTGAAGATGCACCTTCGTGCTGCTGGCGCCAGATTGGTATCCCGTACTGGGACTG**
GACCAAGCCTGGCACTCAGATTCTGCCCTGGCTGCTGAGGAGACTTACGTTGATCCAGAGAAGTGAG
GCTGATTA AAAATAAGATGGATAGATAGATAGATAGAGAGAGAGAGAGAAAAGAGAGAGAGAGAGAGA
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAAGGAAAGAGGGGTGAAGAGAAAGAGATAAAATAGATAGATAG
ATAGAGAGAGAGATATACAT
ATATATATATATATATATATACACACAGAGAGAGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGAGAGAGAGATGGCGTGTCTCTGACGAGATCGAGGGCGCGCTATAATTCTTTTAAATGGA
TAGAGCGCGTATCGTAGAGGATGGCCTATTCAACAACCTCCTCACGCGATTCTATCAAGGTGCCGCAGA
ACCGTGAATCGTTAAATCTTACTCTCACCCCGGGCCCTCAGTGAACGAATACTCTTTCTTCGAGCTTT
ACAACAAGATCCGTCTCCTCAGCCTGATGTCTGATCAAATGAAGTCTAACCCGCCTCGCTATTTGT
TAGCGGCGCCAATGTAAACAATAGCCCGCCACACAGTTATCCCTTTGTTAATATTGAGTGTCTGCTCA
AATTTGCGGAGCTCTTCTGTATAGAGCCGA.....CTTCATCGCA
CTGTGGTGGATTCCAACAATCACCTCCGTTCCGTATCCAGGTTGTTTCTGTACACTTTGTAATGTCAT
CTTGACCTTCCACCTGGTCTTCTTTTGTATTGTTTTCTTTTTCTTGGTTTTTCATTTCAGTGCATCTAT
TTGTCCATCTGTTATCCTTCATTTGACAGATATGTTACCAGCCCTGTTCCATTTTTGTGCGGTGTATAA
ATTTTAGGACATCTGCCACTCATGTTTTCTTTTGTATTTTTGTGTGCTTTATTTTCATCTTGCATTCTT
ATGCACAGTACAAGAAATAATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCA
TCA
ATT
TATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATCATCATTATTATTATTATTATTCTTCCCTAG**CGGCGAGACT**
GTCAGGAACCCGTTCTTCGGCGCTGACGTAGCTTTCTTGAACAGCGGAGCAAAGACGTCCCGTGACGT
GTCCGACAGTTTGAATGACGTTCCCGAATGGGAGATCACACCAATCTTTTCGACCAGTATCTCTATG
CCTTGGAGCAAGAAGATTTCTGTAACCTTTGAGGTAAGA ACTTTAAAACGTGACCTTCTGTGCAAGAGC
TCGGGGGTGGGGGGGATTACCCGTTGGAAATCGTGAGGGTTTCATCAGTCTAAGAGTTTGTAGATGC
ATGAGCGTATTTTTGTTCAACTGTTGGGTTGATTATCAGTGTGACTTCTTATTCAACGAACAACAA
CAAAAATCACCAGATTGTGGCTAAGAAGTCCCACCCCGCTGTCTGTCCCATATGCTCTTCTATT
CTTTTCTAAATATTTCTCCTTAAACTGGAAAACCTTGTCCATCTGTTACCATGCAAACGTGATTAAT
GAATTATCTTCATTTCCAGAAGACGCACCCATTTATAAAGTACATTTTTCTTTCTACGTACGCTACTT
TTGTACATATTTCAATTTAAATCCTCAGTCATAAAAAGCACACAGGAGGAGCAAAGGTGGGTGCTCTC
GCCGGA.....TGTTGCCTGCAGGTGCACTCTAGAGGACCCACTA
GTATTTCTATTATTTATTGGACATAATTTCCCAAGTTGTGTCTCAGTTTACTTTTTAAAACGTCTTT
GAGTACTGGGACCACCTTAGAGACTAAGGGCAGATGTCTTTTGCAGGACCAAGTTGTCAACAATATTC
TCTGAGACATAAAGAAATCACACATCGTCTGTTAAGTTCGTTAAGCTGTTTCAGTTGTTCTAGGCTGAGA
AAAATAGCTAATTTGTTTTCTTTAAAACATTGCACCTATATTATGTGTCTTTTCTTGGCTTCTTCAACT
TTCAAAATTTAGATTTCAACAAGATAGTTCTTTAGTACTCGCAATTGATACCACAGCTTAAAGAATACA
TTTTTGGCTTATTATATGTACATCGGAACAGCTGACTGATATATTTAAAATTTACTTGTTTTCTCTCA
CAG**GTCAGTTTGAAGTAGCCATAACTTGATCCACGCCCTGGTCCGAGGCAACACCCAGTTTGGCCT**

CTCTTCTCTCTCTCTACAGCGCTTTCGACCCCATCTTCTTCTGACCCACAGCAACGTGGACAGAATCT
GGGCCATCTGGACAGCCCTGCAGCAGTACAG GTCAGTGCACCTCTGTGATTGTTGTGTCATGTGTCAAGT
 GTTATCCTTCTCTAATATATGAGTACTGGTGTCTGTGCTGTTGGCCATTAGGCGCTTTCGATGGTACA
 AGCATGTGACGTGAGTTCGATTCCCCGTGTGGGGAGAAATGTTTATCGAGTATCTTCAATCTTTTCTA
 AACCTTCCCCTGATAATCCCCCTGATAATGGTTAAATCCACCAAGGGTCTAATAGATTCTTTGGAATG
 GGATTTTATAAGAGTAAAGGTGATTATAATGTTTTGCAGTTTTTTAGACGTTCAAGTTCTCGCTTGTC
 TAGAAGCAAGAGGCTTTGTTTTATGTCAGAAATGCAAGTTCGAACCTTTTCAAGATAATTTACAATCT
 GTTTTATGTAGCCAGCCAAAGTAGGTGAGATCCTCTTCTACTATAAACTTCACATTGCTCTTAGGCGC
 GCTCAACGTGTTTCAGGAACCTTCGGGCATTTTCGTGGTTATTAGAGAATACACAATAGTACAGACAAAAT
 TGTTTCATGATGGCAGTCCATTGTCAAGGAGAAAAATGATCGTCTAAGACAGGCAGACGTCATGGGCAG
 TGTTATCTTATATAAACATGCATGGGATATGAACTGATGCTGTACTGGTGACTTCTTGACAGGTGACG
 TAGAGAAGCTCACTGTACTCATTTCCTACCCTGCGATTAGAACCGGAGAGGAGAAAAGAAAGCCAAA
 GTTACTCATGGATAAAGATTGTCTTCATCACTACATCATAGAGGTCGCTCTCTGCCCATCCCCTGCT
 GATTCAATTTATAAACTCTATTCATTTTCTATTCTATTCTAG**AGGAAAACCGTACAAGGCTCATTG**
CGCCCAGTCTACGTGAACCAGCCACTGAAGCCGTTTCGCTTCTCCTCTCCTCTGAACAACAACGAGA
AACTTTCTCTCACTCCGTACCCACCAATGTCTACGACTATGCGGAAGAGCTGGGATACGATTATGAC
AACTTGCAGTTTGGAGGCATGGGAATTGCCGAGTTGGACCAGTACATCAAAAGCACCCAGAAAAGCAA
GGACAGAGTTTTCTATGGTATTCTTTTGCACGGGATCAAGAAAGCCG GTAAGTAGACGTGCAAACCTCC
 TCAAAGTTCTGATAATTTAAGGAATAACAATCTTATTTCTGTTTTGTGTAAGATGGTTGACATATGCC
 GTAACATTGTCTCTAATCTTCTGCTGATTGGATATATCTGTATGTCCGATATGCTTCAAAAAGTTAA
 ATGACCAAAGCGTAAAGGGAACAATATGTGACTTGATTCTTTGATAATTATATACGGAAAAGAACTTTA
 AAGGTTTCCGTTGCCATTTCCAG**CTCTTGCCACTGTGTACGTGAAGAAGCCTGGCGTTGACACGGAGT**
ACAATGCCGGACAGTTCGCCCTGCTGGGCGGCCCATCGGAGATGGAGTGGCGTTTTTGACCCGGAAC
AG GTAATTTTTGTTTTGATCTGCGCACACGCTTAATGTTATTATGATTTGGCCTGCCTTACTTTGGC
 AGGCCTTACTTTGGCTTATCTAGTACAGCGGAAGCTATCTCTAAACCTTTTCATACGGAGCCAATTTTG
 TCATCCAATTTTTAAGCATTACAGTTTAAATAATGCTTCGTTTCAACCTTATTGCATAAAAACAACATA
 CACAAAACCTGAGAAAATATGAATGATCCATGCAATAAAATACAGTTCGATTATAGATATAATGGACTT
 GGTCCGGTTTTGTAGATTTTTGTTATGACTGTGAGCTACTGAGCGATGACTTTCGGCAGCCCCTGCAA
 GCTGTATATTATTATGAATATAGCACACCCGATGACTGACACGTGATAATGATTTGAGCCCATAGCTG
 TTCTGACGTACCCAAAATGAGGGAATCCACCACAGTGCATGATG.....
AGGTGGGAAATTTTCATTCATCCCCGCCAATAAAAACAAGTTGTTTTTTGGAAAACAGGGCCTT
 TTCGGGTTTTGTTAGATTTTTTATGGACCTGAACCACCGGACGATGCTTTTTTGCCAGCCCCCAATGTT
 GTATTTTTATTATTGAAATAGACCCCCCTTTGCTGGCCCCGTGATAACATTTGCGCCATACTGTTTTT
 CGCGTACTCCAAAATGATGAAAACCCCCCCCCACTATACCCCCCCCCCTGAAAGAAATCCATTCCCCA
 GAAACGTCCTGTGTAATATGGTAGCGAAAATGACCTCCAGAGAGTGACGCATCTGTGTTGTTAGAA
 ATATCTCGAGTACGAGATGCACATTTTTAAAGTTTCTGAAATGTCAGGGTTCTGTTAGCCTGCTCG
 TTTTCTCTAGAGACAGAGTGAG
 AGAGAGAGAGGGAGAGAGAGAGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAATGAAAGAGAGAGAGATAGATAG
 ATAGATAGATAGATAGAGAGAGAGAGAGAGAGATAGAGAGAGAGAGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 AG
 AGAGAGAGAGGGGAGACAAAACCAAGCAAATTATTAAGAAGCAAACAATCAAACCAAACCTTCTGAAT
 TTTACAG**ATTTCGAGATTACCAAGGCCCTTGAAGAGCTTGGGATCAACTTTTTGTCTCCATTCGACGTC**
CGCCTTGAGATGAATGAGTTTGATGGTACCCCTATTGACGTGAGTCAGTTCCCAAGAGTCAGCTAAT
CTTCAAGAGAAGGGATA GTGGAATCCACCACATTGGGAGCTG.....
GAATCATCGCACTGTGGTGGATTCTTTGTTCTATGTACGATCCAG**TTCTGCCCGAGGCGCAAATTG**
ATGAAGTCACAGTCCGTAAGAACGTGGACTCTCTGAACGCCGAAGAGGCTTGGCTCTTCGCCGTGCT
CTGGCCAACCTGAAGGAAGACTCATCTATCGGTGGTTATCAGACCCTGGGCAGGTACCACGGAACGCC
CCTATGGTGCCCGCCCCTGACGCTGAGAAGAAGGTTGCTTGTGCTGCACGGAATGCCCGTGTTC
CCCCTGGCACAG GTAATAACAGTGTGCAACTGAGTTGTTACACTTTATCTTGTTAAATTTACTTCTC
 AATCGCATCAGTTATTTCTTTTTTAAAGTTTTGAGAAAATAAAAGTGAAAAGAAAAGAGAGGGGCTC
 AAATCAGAACCATGAAATGGGCACCTCGTTCAAGTTCAATTGTCAAATAAAGGAAGGAAGTATCGA
 AACAGAAAAGAAATTATAATATTGTGAAATGACTCTTGATGTTTTTATTCCGGATAACGGCTTTATCAGG
 AAAC
 AC
 TACACACACACTCGCATTTTATGATTTGGGCATGTGTGAAAACCGCTGAAGGCATATGCTTATTAATA
 ATTTTTTTATATCTGTTTCATGCTATAATGTAACAAGTGCTGGATTGTCTGCTGCCGAGAAAATCGGG
 TGCTGGGAGGAGCATTGGGCACTTCTTTAGGCGAAAGGGGGTGTATAGAGAGAAAATTTATTTATTTT

TCGTTTTGTAGAAATTC CAATTCTATAAAGAGAAGGAAGCGAAAAACAAAGTGAAACAAAACAACAAG
 AAAAAAAGAAAAGAAAATATACATAGAAAACAAATGCAGTAATATTTTCTTTGAAAAGGAAAACAGTTTA
 TCTTTCTCTCCTGAACAATTGTGCAATTTGGGCTTAGAATGGTGGAACAGCTTGCCAACCGTATATTT
 TTTCGTGTAG**GTATTCGATTACCAGACCAACTTCCACTACGAGTACGACGCTCTGGAGTTCAACGGTC**
TGTCCGTGCCACAAC TGGCGCGCTTCTGGAACAGAACAAGCCGGAGATCGCGTGTGGTGGGTTCC
ATGCTGCACGGCATCCAACAGTCGGCGCTGGTCAAGTTCTACATCTGCAAGTGAGTAACTGTTAAACT
 CTACTTCCGGAGACGAGAAGTATTTTTGAAAAAGAAGAAATATTTTAACTTTTCAGCTTTTCAGCAA
 TAGACAGCAGAAGATCTTGCAAGTTTGTGTAAGTGTGGTGGAGCTGATCGGATGCTTGTCAATAATGG
 TTCTCTGGAGGCCGATAATATTTCTGAGTCGTCTTCGAGGGTGTGCAGAGGTAATAATAGTTCAACGC
 CCATAGAATGAATCCACCACATTGGACTT.....CGATTAATTTT
 CAGAGTCGCCTGGAGGGGTGCAGAGGTAATAATAGTCCCAACCGCCCATAGATTCCGTAGTAAAGTTG
 TTTATCCGCTATAATGAATGCCGGTGTGCTGCTGCAACTGCTGATGATTTTGTGATGATGGTGATA
 ATATTGATGATGATGATAATGACGACGATGACGACGACGATGATGATCATCAATGATAATGACGA
 CGGTGATGGTGTGATAAGACCGCTTTTGTAGCCATTGCTTTAATAGTTTCTCGTTGCGCTTTTCCAT
 AG**GGAGCGACGATGACTGCAACAAC TATGCCGGAGAGTTCTACGTTCTGGGTGACGTCAACGAGATGGC**
CTGGTCTTACGACAGGCTGTACAAGTACGAGATCACCGATGCCCTGGCTGCTCTGGGGTTGAGATACA
ATGATCGCTACAGTGT CAGATACGAGGTCTTGAATCTACAAGGAGAAGACATTTGGCCAGCCATTCCCT
ACCCCACTGTTGTTAAGGAAGATGGAACAAGTAAGCCTCTTTTCTATTACCATGTGCCCTTCAACA
 ACAGGAATTTTATTCTCAAACAACAGTTAGGTGCATGATGGAGTGTAGAAATTACAATTATGTTAC
 CTTTTATTATGGAATAATACATCATCTATTGCGTGAAGATGCAATAGATCCTTTATTCTCTGTTTTT
 GCGAGATACCCCTCCTTTCTATCCCAAAGCAGTGCTTAGTATCCCGAATTTCAAGCTCCTTAGGCA
 AGACGTTCTTATTTCGGCCATAAGAGGAATAAATGACGTTTATGAATAGATCTGAGAATACACCACAG
 TGCGATGATCCATTC.....CATGGCTAGACAGCGTTCTTACCTA
 AAGAGAATAAATGCGTAGATAATCGGTATTCTGCCGAGTTCGGTATTTCCATCCTTTATCCGACTCA
 GTCCCATGGGCATCCTCGCATCGAACAGTGAGAGAAAGTAGCCTGCATGTCTGTGGTATCAAAGTTTA
 AGTTTTCCATCAACGAACCTGAAGAAGTTCCACCTACTACTATGTTTAGGCAGAGAGATCGCCCCCTT
 GAGAAAGAGAAAGACGGTGTACATCTTGACGAGTGTGGGGTTTGTGATCATTGTAATCTGCCTGCTA
 TTACTTTCTTTACTTTTTTTCTCCTTACCCATCAATAGTTAGCAAGATCTAAAACCTTTTTCTCTGT
 TGGATATTAAGTCGAGATCAAATTATGAGCGAGCTCTAAGATAAAGTTCTTCATCAACATGACATC
 CATCTCTCAAAG**GTCAGCTGTACGGCCAAGAGTACCGTGAAGCTGTGACAGCGGCGTCTACGTGCG**
CCGGACCTGTCCACTCTGAACGAAGGCGAGGTAGAAAGTCTGAGAGCCGTTTCTCTCCATCCAGA
AAGACGACACCTACGCCAACATCGCCGCTTCCACGGCAAACCTGGACTGTGTGAGCTCAACGGACGC
AAGGTTGCCTGCTGTGTGCACGGCATGGCTACTTTCCCGCTTGGCACAGACTCTATGTGGAGCAGGT
 ATGCCCCGAGCAACTGATTTAAGCCGCTAAATAAATAATTATTAATGAAAGACGAAACGTTTAACCCG
 CATTATAACGAAAGTCTGTGTATTGCAGGTGTTAAATTATGTCCACCACGCTCGATGACCCGCTCT
 CTCTTACATAAAGACATGAAGCCCAATACAGTGCAGTTAAAAAAAACATAGTTGTGTCGTCAGGGTTC
 CGAACTGACACTCGAATCCACCACATGAGG

Abb. 49: Genomische Sequenz des AcH1 vom Intron UTR1/2 bis ins Intron d1/2. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, lila: 5'UTR2, türkis: Signalsequenz 1, blau: Signalsequenz 2, orange: kodierende Bereiche der FU-a, oliv: kodierende Bereiche der FU-b, dunkelrot: kodierende Bereiche der FU-c und dunkelblau: Exon d1. Punktierte Abschnitte bezeichnen Intronbereiche, die nicht durchgehend sequenziert sind.

TATACGCATCTGAGCTCATGTGGTGGATTCAATTCTGGTGTCTCCCGTCCACAG**AGACCCCCAGCCC**
CAGCTGTTCAACAACGACTACTTCTACCAGCAGACTCTGTTTGTCTCTGGAGCAGACCAATTTCTGCGA
CTTCGAGATCCAGTTTGTGTTGATCCACAATGCTCTGCACTCCTGGCTGGGCGGACGTGCTGAGTACT
CGTTCTCCTCTCTCGACTACACGGCTTTTGTACCCTGTCTTCTTCTTGCATCACGCAAACACTGACAG
 TGAGTCAGCGTATTCTTGCTTGAATAAACAGTTCTTTCTCCTCTTTCATCTTGTCTCGACTGCATCA
 TATTTGAAAACAGGTATACTGGTGCCTGCTACGTTTCTGTTGGTTCAGTTTAAATGTTTCAGGGG
 CCTGTATGTCTTGCCTCTAGGAAGATGTGTTCCAAGGTTAATAAACGTAATGTCGGAGAAAACCTCGT
 GGGGCGAGCGGGCAGCAGGAGATCTTCAGAGGAAGAACCCCTTTCAGCAAGTTTTTTCGGCCTTAACT
 AATTGTTCCACGATTAATAAACATAAGAAACAATTTGATCATAAAAACCCCAATCCTCACTTTCCACG
 AAATATTTTTATCTGAAAAGGCTTACTGTGCAATGCGTTGGTCCGCTCTTGTCTTTACTCTGCGAAT
 GAACAAAAAATCTTCACTATTTCTTCTGGCTTACTATTTCAAGAGAGATTTCAAATGTCAGTTTTAA

TTTTGCCTAACTGGAACATCTGTAATTTGACTTGGGCAATGGACTTGCTATTACCAATAATCTTATA
TCCCTACTACTGCTATTAAAACAATACGTGATTCAGAGAAAGTTAGTGAAAATAGTCTCTAATAGTGCA
AAAAAGGTCTGCCGATTTTTGCAAAAAAAAAAATCTCCTGAGGCCGATTAGTTAGTAAGCTCAGGCTC
ATCATAGATGCCAAGCATTTCAGGTGACACGACGTTTTCGGTGAGTTGTCACTGGGATGTGTCCTTGT
GCAAGACACGATAACCCTGGCTAAAAATAAAACAAGACAACTAAAACAACTAAAACAAAAACATGG
CGCTACAAAGCGGTGACCACCAATTGTATAAAACACCTTATAAACCCCTGGGCTCGTAAAATTACTACT
GATTTCTTTTTCTGTATCTGTGTCCAG**GATTTGGGCCATCTGGCAAGAGCTGCAGCGTTACAGAGGCC**
TGCCCTACAACGAGGCTGACTGCGCCATCAACTTGATGAGAAAACCCTACAGCCTTTCAACAACGAC
GACTTCAACCACGGTGACGCCACAAACAGATACAG.....GGACA
AGGTGACTCATGGTGGATTTCGAATTCACATGCTACATTATTTCTTTTCCCTTACCAG**TCGTCCCG**
CGGACAGTTTCGACTACCGCAACCACCTTCAGTACGAGTACGATACCCTCACCTTCAACCACATGACG
ATCCCGCAGTTGGAGAACCCTTCTGCACCAGAGACAGGAGAGCGTCTGTGTGTTTGC CGGCTTCCTTTT
GCACAACATCGGAGCCTCCGCTGACGTGGAGATCTACATCTGTGTGCCAACTGGACCACGGGGCAAGA
AGAAGTTCGGGAACCAGAGTATGTTTCTTCAGCTCCAGTAACATGCAATTTTCAGTAGTTTCGCCTTAATT
GTATCCAGAAATCAAAACAACAACGACATCAATAGTAACAACAGCAATAAACACCATCAGCATGCTTC
ATTTCAACAATAAAAAGTGACCACCACCACCGCCACTGCAACAACATAAAGGACGACAGCATCAAT
ACCAAAATAAAAACAAAACAAAAACCAAGCAACAACAATAACAAAAACAATAATGATAACAACAACA
ACA
AACAGCACAACGACCACCATCACTAACAGCATCAACAGCATCAAAAGTATCAGAAACAACAGTAACTA
TGGTCTGTAATAAATAACTACTACATCACTGCAAGTGGCATGTAATAGGGATAAGGGCATATTGTCTT
TCCTCCTACTCACCTGCATAAGTAAAGGGGGCTCCACATAAATTTTTTTAAAAGCGTCAAAGGAGG
ACATATTTTCGAATAAAAACACACAATAATGGTCTACGGATTACCAGCTTCTGTGGTGGTAGCTTGT
AATGCGC.....TAGCTCATGTGGTGGATTCTTGTCTCTTTCCAT
TCCGCCTTCTTGAGATGTTTTGGTTCCAATCCATGTTTTTATGTCTGCCCCATCTTCTGTAAAGCC
CCCCGCCCTTCTCCTCCCTCCCCCTCTACCTTGTCTTTCAGATTATTGTTTCTCGAGTAAATTATAT
TAAAGTAAAGACTAACATTA AAAAACC CCGAGAATCTCTTCAATGATATTTTCTTCTGACGTCATCAT
CAG**GCCGGAGTATTTCCGTCTTGGGTGGACAGCTGGAGATGCCCTTCGTGTTTGACCGTCTCTACAA**
GTATGACATCACGCGCGCTGTGAGAGACCTGGGACTCAGGCCGACAGTGGTCCAAGTTGACCTGA
AGATCAACATACAGCTGTCAACGGAAGCTATCTGAACCCAGCCTCCTGCCGGCGCCAACGGTTCTC
TACGTACCCGGATCTAGTAAGACCTTATTCTTTTCAATTAATTTCCAGGCTGAAATCAAGCGAAGCTTAG
TTCATTTTCACTGCTAGTTTTACGAAAGATATATCTTTTCACTTTTGTAGTTTGGAAAACAAA
ACTGTTTTTAGAAATCGTAGCCTCTGGTTACACGCCTTGGAGAGAGAAAAACCGGGGGGGGAGGGGG
GTTGGGGGGGGGAGGGGGGTGGTAGGATGGTGGGGTGGGGTAAACCATATTGTACGTATTTATTCTA
ATGATTTATTTTACGAGATTGAATTCAGTACTTTAAAAGCCATTTCACTGATATTACTTGTGTATTCA
ATCTATTTTTTTCTCTGATATCAGCGTTAAATGTTTCAGATTATATGAGATCACTGAAACCAGACCTA
GCCTCCAATAGCACCAAAAATAAAATCC.....**ACGAAAGACAAG**
AGGCTGACGGCCAGGTCGGAAACTACCTTGTGAGGAAGAACATCGCTAGCCTGAGTCCCCAGGAGGAG
TTGTCTCTCCTGAAAGCCATGGCTGCCCTGCAAGCCGACAGTTCGGCTGACGGATACCAGTCCATCGC
CTCCTTCCACGCCATCCCCCTCTGTGCCAAGCCCCAGCGCCAGCAAAAGGTATTTAGAAGGTTTTG
ATAACAATGATATTGGTATTTCTTTTTAGGGAACGAAAAGCAACAACAGTAAGGAAGAAACGTGT
GGTTACCAAGTGTCCCTACAGAGGGGCAGGAGGAAAGAAAACACGATTGTAGTTACTGAAGACAACAT
TCTGAAGTAACTGAAGTACACAAATTAAGCAAATCTTCAATAAGAAATGTTTGCAATCAGTCTTGC
CAGAATGATATTTATCTGCGATTAAGCACACACGATTCTTTATGCCGTGGCTGTCTTGAAAAGAGA
GCTTAAAGGACACCCTTATTTCTACACCTTTAATCTCTATGATATGCTAGGTTACAACCTGCTAGACC
TCGGATATCACATCACAGTGTCTTCATTTGTGTATTAGACTATCCGTAACAATCTACCACTGGGATAC
TTGTTCTATCAGAACGACATCGTCACCATCTATCAATTACCACTCTATTATTAGCTTACCAGCATTC
ATCTCCACATCCCCAGACCATATTTATATTAGTGACCCTGCACTCATCTGCTCCTTACACCATCT
GTATAACAACCAACCAGCACCCCCCCCCCTCAGACCATCTGTATATCAACCATCCTGTACTCATCTCC
CCAACAG**GTACGCGTGTCTGTGCACGGCATGGCCACCTTCCCCAATGGCATCGTCTGTACACCGTC**
CAGGTGGAGGATGCCCTCAGACGTCACGGCTCTCTCGTGGGCATCCCCTACTGGGACTGGTCACGCCA
GACTGACCATCTACCCGGACTTCTGGCCAACCCAACCTACACGGACGTGTACACCGGACAGACTATCG
ACAACCCCTGGTACAAGGCCAGGATTGAATTTGAGAACACAACGACCCGAGAGAGATGTACAGGTAATA
CATCGTCTCATCTTGATCTGCCAGCGCAACTGAAGAACGGCTTGACAACTTAACGATTCTAGAGTA
TTTACGACTTTAAGACACGGCACATTACACTGCTCTATTTCGGTGTGTTTCTAGGCATTCTTAGTTTTA
TACTCTATAACACTGACTGTTTTAATATTCTTGCCCTTTGAATTTTATTGAGGGATCCATTATTAATT
TGTTTATTTTATTGCTATGTGATACTTTACTGCACTTTCCTTTTACGTTTCAG**GGTACTATCTGTTC**
AAGCAAGCCCCACGGCTTTGACACTTGGCTGTTCAACCAGGCTCTGCTGGCTCTAGAACAAGAAGA

AGTCGCTTGTGTATCCATGGCATGCCACGTTCCCGCACTGGCACAGGCTGTTACCTTGCAGGTAA
 TGTTAATACCGATACCTGATGCGATCACTACAGCAACGACAGAACCCACAAACATAATGCTGTGATTA
 TATAAACAAAATGCAGCACAAAATAAACGTATTCTTGTGTTGTAATGCAACAGTTAGACGCTTTGCTGT
 GCCACGCAGAAGACATGGGTTTCGATTCTGTGTGGGGAGGTTTCTTCAATCAGATGTTCACTCTCTGT
 TTATTTGTTTCCCTCTCAATCCAGGTTGGCTCTGTAATAGTCAGGGTCGAAGAAGCCTACCTCCTAAT
 TGATCTAAATAGTTTACATTGGGCATTGAACATCTGCAATGCATTATCTTTACAAATAGAAAGATAAT
 CGATAGAATAAGCTCTATCGTCACTTCACCAGAATCCACCACAGTGCGATGAATT

Abb. 50: Genomische Sequenz des Ach1 vom Intron d2/3 bis ins Intron f1/2. Das Exon d6 weist im Vergleich zur cDNA eine Deletion von einem Codon auf, ist aber ansonsten zu 100% identisch. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, dunkelblau: kodierende Bereiche der FU-d, rot: kodierende Bereiche der FU-e und hellblau: Exon f1. Punktierte Abschnitte bezeichnen Intronbereiche, die nicht durchgehend sequenziert sind.

AACTCATGTGGTGGATTCTCGGAGAACATATTTTGAAAGCAAAGTAGATGGCTAATAATGCAGGAAG
 ATAGCTAACAGAAAGATGAGAACAGGACAAAGAACTTGCTTGGAGCCCAAACAAATTCAGTCAGGCAG
 AATGACTAGAGACAGAGCGTTTTATTGCAGGAAGGTCCGAGAAGTAACGACCAACTACAGAAAAAGAA
 TACTGTAAAATTTGCACAATAGCAAATAAGAAAGATAACACTTTCGTAGATTTAAAGACCCCTTTTC
 GAACGTCAGTGCAAATCGAATGTTTCTTTTCTGTTTTTATTTTTTTTAAATAAGAGAAGTACATAAA
 CACAATAATGGTCATACAGCGTACGGAAGAAATGAGACAAATAAACGGCGTCTTTTAAAGACCCGCCG
 TTTCTATTTCTCCTCACAGGTTTCAGTTTCGAGGTGATGCACAACGCTATTCACTTCTGTTCTTTATCCATCATT
 CTCCAACTTACTCTCTCTCCTCCCTCGAGTACTCGGCCTACGACCCTCTGTTCTTTATCCATCATT
 CTTACCCGACAAGATCTGGGCCGTGTGGCAGGAGCTGCAAACCAGACGCCACCTGCCCGCCAACAAG
 CTGACTGTGCTCTCAACTACATGAGCCAGCCATGAGACCTTTCTTCTTCGAGGGTTTTCAACTTGAAT
 AAATTTACCATGTAAGCAACTGTTTTCTTTTATATATGAAATGGAAACGAGACAGATTTGCACAGAT
 GAAGCGTTAAAGTCCAACCTGGCAGAAGATATATTATGATATAATTGCTGTAAAAACGGTCTCGTGTAA
 TCTATAATCCAGTGCCTCGTAAAATTGCACGCTAAAATTTTCGTAATTCCTTTTCGCGCTCCCCCAA
 AAAGAAAGGCGAGACAAGCACTGCTTTAGTCTAAAATAACAGTGTGGAAGCCCGCTCCTAAATGA
 TCTAAATTGTTGAGCAGATGAGGAGTAAAACACCTGCATTACACTTTTGTATGTAATAATGATAATTA
 AAAAAATAATAATGGTAACGATAATTATTATTAATAATAATAATAACAATTATGATCCGTGCTTT
 GGTCAGTGCTATGACACACGTTCTATCTCCGCAGGGACCACGCTGTGCCCAACTGTGTTTCGACTA
 CGAGCACCTCGGCTACAGCTACGACGACCTGTCCATTGGAGGTTATGACCTGGACGGTCTGGAGCAGG
 TCATCGCCGACCGCCAGAGCAAGGCCAGAGTCTTTGCCGGGTTCTGCTCAAGGGCGTCAAGACATCC
 GGCTCGGTGGTCAACATTTGTCTGGTGAGTTGTCTGTGCATGCACTGTGTTTCTTTATTTAACAAA
 AAATGTACGTGTTTTGTTTTAAACCTGGTTTTAAACCAAGATAGCTGAAATATGCAGATTGACATAAA
 AACATGGTATTTTTGATGCAGAAAGGTTTCGAGAAGTAATGTCCAGTTACTGAAATATGGCTAAGAGGA
 AGAAGGGTGTTTTTACACCCCTATCGAAACACAGTTTAGATCATATAGGCGACCGACTTTGACCCTGT
 CTGTGAGGGTCAACTCTGGACGAGAGAGATACAAAGTTCCAACATAACGATTGAGATGCTGGATAAAG
 AATTATCCTCACACGGTAATTGAATTTGGGTTTGTGCTGCCTGCAATAGCGAAGGGCTTATTCGCTACAT
 GACAGACACCGGTGCTTTGTGACTCAGTATGATAGTGTGTCCGGTCATTAATTGTGTCTCATAATAGT
 ATGTCTGGTTCGCTTGTGTGCTATGGTGTGTGACGTTTATAACAGTGTGTGTTAAGAATCCACCACATT
 GAC.....CTCATGTGGTGGATTCTGATGGGTGTGTATGTGTTT
 TTAGCGTCTCTGTGAGAGATTTTCTTGCAGAAATCGAACCGACAGTAATACTCGTACAAGTACCAGC
 ACTATTTTTGAGCTTGGGTTATCGTGTGCTCAAGGACACATCCCAGTGCCACACTCCCCTCCAAA
 ACACACCTTAACACCTTGTACGGGCATGCTCTTGACATTAATTGTGAGCCTCAGCTCACTGACAAC
 CAACCACTGGAGCCCCGCCCTCAGTAATCTGATTAAAAAAATCACAACAAAATCTTTTTTTTCGAAACC
 GACAGAGGAACAATGTGTGCAACTACGCTGGTCGTTCAACCTGCTGGGCGGTCCCCTGAGATGGCA
 TGGGCTTTTCGACCGTCTCTTACCTACGACATCACAAGTGCTTTGGAGCAGTCTGGCATCAATCCAGA
 GGACGCTTTTGATGCCGAGGCACTCTTACACTGGATATCAAGGTCTTCGATGTTGAGGGACATGCGC
 TGCCCTGTGAGCTCAGTGTGTCAGAACCGACCATCATCTACAAGCAGCTGTTGGTGAGTTCAGTGGT
 GCTGTCTTCTGTGGTATGCTGACTTACTCGACATTCTTAGCTGTTAGAAGGATCGTCGTTTTGAGCAG
 CATAGCTTTTTTTCTGAAATGGGAACATTTTGAATAGGCGTAGTTAGAGGATAGTGGTTTGGGGAAAG
 GCGTGGTAGGCACAATTATTCCAAAATTCAGTTAAGATGGCAGATTGCAGTCAAATATTTCCCACTT
 TATTCATAATCAGCATCAAATTTAATGGCTAATAGATCTTAAAGAGGCATAACAGCAGACACTTATAA
 ATGGAGAGAGTACATATACACACGTCATCTGCTAACAAAGCACATAAAAAATAATTACTAATTAAGCA

TACACCTAGACTTGTGGAAAAGCATTCTATGTCATAGCCTGGTGATTTCTTACATTGAAAAA.....
AACTCGATGTGGTGGATTTCATAAATGGAGAAGAGTAACAATAATT
 ACAACACGTCAAAAATCTGCTTAAACAAAAGCCAACAATAAAAAATAAATACTAAATAAAAACCAATA
 CAAACCTAGAACATTGTTTAAAAAAGCATTCTATCTATTAGCCTTGTGGATTATTCAATTATCAATT
 GAGGACAAAAACCCCTAGAATTTAATATCTCTACAGCTTTGCTATGACAAAATCGGACGACACGCTAGA
 TCGTCTCAACTCTACGGGGCTGTGATTTGTTCCACTTTTCAGACCTGAGGTTTATTATCTACCTTTTG
 ACAACCCAGAAGCACTTTTCGGTCTCCCGGAAAAGCAAACAGTGCAAGCTGTAAACTGACAGGATCTTTA
 TATCCGTTACACTTTGACCCCCAG**GTGCCTCCGAGGAAGTGTCTTCGTCGTCTTCCCTGGCCGGTGT
 GGTGTCCGTAAGGACGTGTCCACCCTGTCCACTTCTGAGATCGACAACCTCCGTGAGGCTCTCCGCAG
 AGTCCAAGCTGATGCAGGCCCAACGGCTTTGCA**GTGAGTAGACGGTTTTGTGACGGCTTGTAGAGTG
 TAGATGATCGGCAAGCTATTCAATTGTTTCTTACCTCTGACAGCATAAATAAATTTACTTTCGGCGTGAGA
 AAGGCCAGGTCTGACAGAACCAGCAGGAGAGCAGCAATCACAATGGGTTTCAACTCATAACGTGGGG
 CTTTGGCAATAGGAAATGCTGAATCCAAGAGAAAAGCGCGAAAGCTGCGCACATCCACAATGTTCAA
 ATGTGGCAAATATTTCTCTGCCAGAATTGATCTCATCGGCCAGAGCAGAAGTCAAAGTCATCTTAA
 TCTGAAATTTCTGTAAGTGTCTATTTTCGCTAGAGCGATATTCTCCTCTGAAGATCTACTGGTTATCG
 TCAGAGTTGACGGACGAGCTATTATTATCATCATCACCATCTTTATAACCCCTGATAGAAAAATTATAC
 GTACATTATATATCATTAGTTTTTTTTTCAATATTTAAAATGTTTAGGTCACCAACATCATGCATGCT
 ATCAAAGATGCAAACCTCACGTTTTAAATTTTCTTCTTCTTCTTATTAAGACTCGAAATGTACCTCCAC
 ATTTATTTTGGTCTGCTGCTGATCTCACATATTATTAAGTGTCTGCTTCGTCCTTAAAGAGTTAACAT
 GCTTTACGGTATTTTAAAGCATGTTCAAATATTTCTTCTTTTCCAG**AGCATCGCCGCCTTCCACGGA
 GAGCCAGCAGGCTGTGAACTGAACGGTCGCCGCATCGCATGTTGTCAACACGGCATGGCCAACTTCCC
 CCAGTGGCACAGACTTTCGTCAAGCAGTTTGAAGACGCTCTCACCGCACAG**GTACACTTTTTAAAGA
 ACACCGTAGGATAAAAACAACAAAATGATACCCCTTTTTAACGTATGTGCTACGATAAAAACAATATACAC
 GATTAAAGGAAGTCATAAATACGAAAACCTGTCTAGTCCCTCATGGTTGCACAGTTTTTAAAGAATACCG
 AGTTAATACTTAAAGGGCTTAAAAAAGACTCGCACTTTTCAGTGGATGTATTTCAATAGCTCTGTAC
 AAATTACGTGCACCAATACCTTTTATGGCATAACGTTTAAATTTTAAAAGCCTTTTGATTTCCAGCGCT
 TATATACTTATCTTCGGACTTAATATAAATGGGCCATGCCACGTAGAAAATTGTTTATTTGTGCGAGTA
 TGTAAGACTAAACTGCAGCTCAGAAGTGGATTTACAAAATCATTCTATAGAGCTTATCATGCAGGC
 CTGTCAAGGTACTTTTGTCCCAACACTTTTTCCGCCGCCACTTGTGATGAGCCACACATGATCTC
 CCCCAG**GGCGCCATGATCGGAATCCCGTACTGGGACTGGACCACGGCCTTACCAGCTCTGCCTTCCCT
 TGTCACAGAGCAGGAGAACAACCCCTTCTACAACCTTCAAGATTTTCAACGGTGAGGTGACGTCACGTG
 CTCCCAGAGAGCAGCTCTTCAATGACCCCGAGTTCCGGATCCGAGTCTTTCTTCTACAGACAAGCCCTG
 CTGGCGTTTGGAGCAGCCGACTACTGTGACTTTGAA**GTAAGTCAAAGTGTGTTAGGAGGTTCTCCAAAC
 GAGGTCATGTATATCAGAACGATGGATACGTAATACACAAAAGAAGTCATTGTTGTAATGTCTTTT
 CAAAAGTCTGATTTCTTAACTCTCCCAAAATCTTAAAAACTCCAATATTTGACGCTGGAGACAA
 AGCGACTTTTATATTTCTTTTCTCTCGACACCGGGCGCAGTTTAGATTACTGAGTACCAAAAACAACG
 TTACTTTTGATATGGTACCATATTCATCCCATCTCTTTTTCTCCTTCCACCGTTCTTTCTCATTATT
 TGTGTCTCTTATCCCCCTTCTCTCTATCTCTCTATCTCTCGATCCATCTTTATCTCTCTCTCTC
 TCTCTCTTCTCTCTCTTTTTTACCCCCCTCTCTTTCAAACACACAAACACTCACACACACCCTCGGCC
 ACACACACTACTTAAATAGGCAACTTCTCATAAATTTTCTTTCTTTCGTCACCTTCTTTCCCATTCTA
 TTTACACAATATGCACCACTATCTTTTCTCGTCGTGGTGTGTAATTTGTTAATTATTGACCTGCCTTT
 CTTCTAGCTTCATTTTCTCATTTCCTCCCGTTCTCCGTGTCTCCCCCAG**GTCCAGTACGAGA
 TTACCCACAACGCCATCCACTCCTGGACGGGTGGCCGATCTCCGTACGGAATGTCCACTCTGGAGTTC
 ACCGCCTACGACCCGCTCTTCTGTGCAACCTCCAACCGGACAGACAGTTCGCCATCTGGCAGGC
 GCTGCAGAAGTTCGAGGTTTGGCCCTACAACAACGCCAACTGCGCCATCCAGAACTTCGTGAGCCCA
 TGAAACCTTTCAGTAACCTGGACAACATCAACCCGACCACCAGAGCCAACGCCAGGGCTATTGACGCT
 TTTGACTACGACAG**GTAAAGTCTTGGCCCTAAACGTTAGTTTTGGTTGTCTAGTGTGTTTATAAT
 AACGCCAAAGGCCACATGCAAAAACACCTCCAAAACAAAACGATTACAAAACAAAACATTTGGCCG
 TCTGGCAGAACATGTATCTATTTTCTAATAAATACTTAAAGAGTCATTAACATTATTTGGTCTGCAGCAA
 TTTAATTGTTTTTTCTCTACGCATTGTGATCTGAAAGAAATAGATACATGTTATAGTGATTAGGATAT
 CTGAGAGACCAGACACTTATGTGGCACTAAAATTTCTTTTCTCTTAAAGATGTCTGTTATGAATCTAGA
 AAACAAGCCCTTTTTATGATTTTATACTCACCTTTCTCCAG**ATTCAACTACCAGTACGATAACCTCA
 ACTTCCACGGCCTGACCATCTCTGAGCTCAATGACCTGCTGGAGAAGAGAAAGGAAGAAGACCGCGTC
 TTTGCTGAGTCTTGTGGCTGGATTTGGCGGAAGTGGTGACGTCGTCTTCAACCTATGTTTCAGAGGA
 AGAATGCGCTTTTGTCTGGTGGTGGCTGTATTTTTTAAATCTTACCTGAGATCAATTGATGCTTAA
 CATGTTGAGATAAGATCTTTTCACTGTCTCAAGCAGTGTTCCTCCCTAAAGGGGCGCATGATTCTGG
 TGGTTAATAACAATGAGGTGCACCAATGCAGAATGCACCACAGTGCATGATTG.....**

TTGCAAACATTTCTCCGGTTCATATTTCTTTAATATAAAAAGTCTTCTGTCTATTCCCTCCCAGCAAC
 TGCAAAAACCTCCGGCGCAAACCTTTCAACTCTGCCCGCTGTGGTGGCGCCATCATGGAGGAACCTCTC
 CAACCTTCAGCTATTTCTCAGGTCAACACCAACGACTTCACCAGGATGAACTCTCTACCCAGCAAAGT
 GTTTGACTATGCTCATCTCGGATATGAGGTAAGGAGTGAGGTGGGGGTGAATCGTGGAGGAATGCAGG
 AGGGTAGGGAGAAGCAAGACAAGAAAGAGGAGGAGGAAAAAGAGGAGGAGGACGGCGACGACGACGAT
 AAGAGGGAGGAGGAGGAGGAGGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAAAATGAGAATCGAGAGGAGAATGG
 GGAAAGGGGGTTCGATGGGAGAAATTTAGGAGCAGAGACAAAAAAGAAGGTATTGGTGAAAGAGGAGG
 TCGAGACTTAAGTAATGAATGCTGGTGTAAAGAAATGTATGTGTTGATAAACATCTATGAATCCACCA
 CATGAA.....ATGTCAAGGAGCGCCCTTGCGGTTCGAGTGGTTTA
 CAAAAAGAGAGGTTGGGACGTGCCACAATATGCGCCCTAAAGTGTAAGAAAACCGTTTTTTGAAATG
 AATCTTTTTTTGTGCGGATAAAGTGTAACAATAGGAGAACAACCCACGAAACAATTTTTTTCCCGCAT
 TAATGTGTCTTATTTGGGGACCTCATCATCATAGTATATGTTTTCCCCCCTCACTTTTTTTGGATTTGT
 GGTTCTGGGGGTTGTGAGTCTTCTTAAGCCAACCTTCTTTTTCTTGGGGTCCCCCTCGCCCGGTAT
 TTTCCCCCCTTCCCTTAGCATAAAATACAAGGCAAACGCGCCTTTTTCTTGTTTACCTTCATTAAT
 GATTCATATACAGCCCCGCGCTGGTGTTTTTTTCATATCCTCTCGCACTGGCGCTGTTACTACCCAA
 GGCTATTCGATCTTTTGCATCTGCCTTCACGCACGCGCTTGTCTACCACAAAATATATATGTGTATTA
 GATCTGCCTCCCCACAGGCCTATGCATATATCTATGTATGTGTGTGTGCATATATTTCCCCCTAT
 AT
 ATATATATATATATATAAATGTGTGTGTGTGTAGGGGTGTGTGTGTATGTGTGTGTGTGGGTGTGT
 GTGTGTGTGTGTATGTGTGTGTGTGTGTGGGGGGGGGGGGGGGGCGTGTGTGTACAGGTGGGTGGTA
 AAAGTGACAACATGATGCATTTTTTTCTCCCCAACTGTGTTATTTTCTGCTTCTAGTTTCGACAAC
 CTGGAGCTGAATGGCCATGATGTGAACGATTTGAATAACATCATCAATAGACTGAGAGATCAGGACAG
 AGTTTACTTTGGCCTTCAACAACCTGTGGAAAACAAGGCTCTTTTGCTTTTTGATGTAAGTAACTGCTTGT
 GACTCAAATTCCTGCGTAAGATTTCTTATCAGCTGTGAAATAATCACCCGCTTACACTCTCTGATCA
 ACGTATTACGTGTCTGTCTGTTTGATAGTATTTGAAGGTGGCGCTGTAACGGTACATTAGTCTTTATCT
 ACTATATTAGTCACTGTTACTTAATCTGCATTTGTTATCGGACATTTCAAACAATGGCGCCGTGAATT
 TTACTGTCTGTTTCACTTCTTTGTGGGTGAGTACAAAGTACAATTTTACTCAGAACTGTTTACGACTC
 AGTAACCCAAAATGGAGTGAAATGAAAGCAAAATGATAATGGTATGATGTCCATTTCTCTGCAGGTCC
 ACTTCGAGACTGCCGAGAATAATGTTGTACCCTTGGCCGCTTCTACGTTCTTGGTGGGGAGCGCGAA
 ATGCCCTGGTGTTTTGAGAGAGTTTTCAAGTATGACGTCACTGAAGTACTTCAAGCCAACAATGTTGA
 CATCCACAAGCCCGTCAAGGTGAGAGGACTAAATTACACGCGCTCTTATTGAAAACGTTAGATAAAA
 AAAAACAGCAACAAAACAATCAAACAATTTATGTACCACAGAGTAATCGCGACCACTATAGCTTGA
 TTCCCTGTGGTGACGATTCCCTTTGCCCAAAAATCAATAGTATAAATTCATAATTTTTTAAAAGAGTT
 CAAAATAAGATTCTGGGAGAAATAGCTCTCTAGAAAATTTAATTTGGGAAAATAATTTGGAAAACAATTACA
 ACAACTACAACAACAAGTAATAATAACCACAACCAACACCACAACACGATTGTAGGGTTAGGGGTG
 GGGTTTAGGAGGATTTGAATTTCCGTTTAAAAGTTTAAAGAAAAAGCAAACCTCCGTGTGGTTTAACTTG
 TCCTTGCTATTCCCTTCCCTTCGTAAATCCTATAAGCCCGCCTTTGTCCCGTCATCTATTTTTATTTTT
 CCACTGCACTCAAAGCCACCCAGTGTCTGTGGTGCCAGAAGGTTAATCTTCTCTGTTGCACACTGAA
 GACCCCAAATTCGATCCCCGAGTGAGCAAAAACTTTTTGTGAAAATTTTCGTTTTCTCTATTAAGATAT
 TGTATCCCTCTCAGTCCGAGTTGGCCCTGATAGGCAGGATCGGAACCCCGCCTCCTAAATTATCTAAA
 TCGTGTGATGAGAACGTAGAAACACCTACATTTCAATTTTCTCCCAAATATTTGTGCTGAATCGTC
 TTTTCTTGAATAATTTCTAAAGTTTAGAGAAATAATCAAAGTCACTTATTATTCTCTATTTCTGAACA
 GATTGGAGGTGAGTCTTTCAGATACGATGGCGAGCAGTCCAGAACTTCACCCTTACTACGCCACGT
 TCATTGAACGTCTGCCGGAGTGGATTACGATATCATAAACATTCCTGTGATGCGTAACAGTTCTATC
 AATCCTAAGGTAACATTCGAAGTTGGTGAATAAAGTCTGAAATGGCGCGAGAGGTTGGGGGGCGCC
 ACTTTTATATCATCATCATCATCATCATTATCATTTCGAAACACCTGAGTCATTTTCAAAA
 GTTTGGAGAAAATCAAAGTAAAAGAGAACCCCGAATCAAACCATGACTTGGGCATTTGTAATTTT
 CAGTTAAAACATATGAAGGAAAACAACGAAAACAGAACATCTCCAATCGTGGTCCCCCGGGACCC.....
ACCTCATGTGGTGGATTCCCCTCCCCCTCCCACACACTTCATT
 TTCTCTATTTTTTTCAGACTGTTGTCAAGAAGGGAACCTCGCGTTCGTTTTCGTCACCGACGGTGTGAAA
 CACCCATGGAAAATCTGGGCAGTTTCAAAAACCTTCACTTCTGCAACATTCCGCCTTTCTCC'TACCAC
 TCCTTCCCGTTCGGCGAGGTGCATGCCCTGAGCCCTGGCGACTACTTCTTTCGTCAACAGAGACGTTGA
 CTTGTGTAACCTCTGGCAGGAAACTGCAGATCACAGTGGCCGACGAGTAACTCTTTCTAAAGTTGCTCT
 GGAGCAAGGTCAGCACTAGACCTAGAATAGTTATTCATTCACTGAGCCTGTAGCTGCCCTGAATGACT
 TCACAAAACCTAGTCTTCAATTGGTAAATAATGTTGAACTGTTACTCGCCAAAATATCCATTGTGTA AAAA
 AAAAAAGTAACTAGAAAACCGACCAAATCTGGCAACATCAAAGTGTCCCCCTCCCCCAATCATTTCAAG
 CATGTTTGACACAATGCACAGATCTGAGGTTACTCTGAGGTCACAGTAGGTTTGTACTTGCATTTAA

CAGAAGAAGGCTGGCTTAGATCGTCGTTGTGCGCGAAGATATAAGGGGTTATGCTGCACTTTTACCCC
 AAATCTCTTTTCTCATAACTACCATCACCATCATTATCCAGTGCCAGTTCTGCGACAGACATCCACGA
 TCATGGTCTCCATTCATTCTTTGCTCGGATGCTTAAAAAGCCACGTTTACTGATCTTTCCCGTTA
 CCCATTTGTTTAGGTTCTCCAAATATATTGTTCTAGGCCTTCTCTGCCTCGCTTGCCCTCAATTTTG
 CCAGTGAGAGCTAGATGTTCAAGACCCTTATGTCTATTTATGGGTCCCAAAAAGTGCATTTGTCGTTT
 CCTGATAAATACCATACAGAATGAAAAAGAATTAAACGTGTATCCTATGTATCCTGGATATACCTGCA
 TCATTTTTAAGTCTTTGGCGGCATCTTACCTGTCTCTGTACCACCGACGTTTTAGGTTTATCTCTG
 TCAGTGCAATAGGCATAATTATAAACAGACAGACAGACAGAGACAGGCAGACCGATTGATTAGATAAT
 TTATTGAATCTGTAGCTGCTGTATAGGCTAGTCTTCATATTATCATAAAAAGATTAAACTGTTACTTTG
 GGAATTTCCATTTGGTATACATACATGATTATTATTTGCAAAGGAACGCATTGTCTGCACATGCTATT
 GTTGAATATCTAGTTTACCATTAAAAATATCAAATTCAGTTATGTAATTGTGGAAACTAATTATAGT
 ATGTGATATTTTCTTTTCAGCTTTCACCTATGAGACATGACGTCAGACGTTGGAGAAGCTATCAGATCAT
 CTTATTTCGTCGTTGCAAATCCCCAAGCAAAGTTTGTGAAATCGAAAATGGAAACGGGTAATACAAAG
 GAAACAGGACACAGTCTTCTCTTTAGCTATATGGCATTGAGCACCCTTTCTTGCATTAAGTGGCTGT
 ATTTTGGGGTCATATTTTCGATTGGACTATGAGATATGTGGTGGAGTTGAAACATTTGTTGTTTTATTA
 TTATTTAAAAAATCATTTTTGGAGTCAAGACTCAGATTTCTTGTTCATGGCTTATTTTTTACCCCC
 CCCCCCCCCCATTTATTAATAATTTTTTCATGAACACATTGATTATTGCCAGAAAAGCACTTAAGAT
 GGCATACGCTAAAACACTTTCTAGGTTTTACAAAAGTGCACAAATTTATGAACCCCAAAATATTGT
 CTTTCTTACAGCCTTTTCTCTTTGACATTGGAACGAAATTTGTATCACCTGATATAGCCGTTTGGCTCC
 AGAGAACTGAGATTGTTTAACTCTGAGACATTAGACTCATAATTGTAATGAAATAAATGCCGCTCTTG
 TTATTCAAATGATGGTGCATTATGCCTTACAAATTTGTAATATTAAGAGGATACACTCAATGACTGGTG
 CCACGTTGAATGTTAAAGAAAAACAACACGTTGTAACATTCATGAGAGTGTATGATGTTTCTTGT
 GAAATGGAATAATGTCTTATTGCTCATGTATAATGCTATACGCAAGCTCCAATGTCCATTCAAAATGT
 AATGCTTTGCGATTTAAAAAAAACAACAAAACCCAAAGAGAGAAAAGAGAAACATTTCTGAGTCTGCC
 ACGTTTACATAGCCCTGTTTGGCAGAATACTGTTATTGTTTAGACATAGTTTATTGGGTTTCATCCTGG
 AGTGCAGTTTTACTTTGTTCAACGAATACTTACGTTTTTCTATAAGTCTTTCATTGTAAAAAAATATTA
 CCTGAAATAAATGTATCCTTGTATACTTACAATCTCTGTCTTACTTCTAAACTTTTTTGTACTCATCA
 TATCAGGAAAACCTGCGGCACAGAGGTCTAGATATATTTTTTTGAGCCACAGTTTGTCTGTCTCACA
 TATTTTCATAGTTACCCGAAGTGCACCACAACGAATATCATTTTGGTGACAAAATCGCAATTTTTGCAA
 ATGAAAAAAGGAAAAAGAATCTACGAATTCAAATAGTTAAAGAAATGTTAAAAGAGGCACAAC
 AACTGGAACCCACATTCATGCAGGGCTCTATACGATCCAAGTCGCGAATTAAAAACGTTACGAAAA
 ACACAATAGATTGCAAGAGAAAACGAAAAAATAAATCAAGGTGGAATCCACCACAATGTACCCG
 TCTTG

Abb. 51: Genomische Sequenz des AcH1 vom Intron f3/4 bis Ende 3'UTR. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, hellblau: kodierende Bereiche der FU-f, rosa: kodierende Bereiche der FU-g, blaugrau: kodierende Bereiche der FU-h und türkis: 3'UTR. Das Polyadenylierungssignal ist rosa und unterstrichen. Punktierte Abschnitte bezeichnen Intronbereiche, die nicht durchgehend sequenziert sind.

TGCTTTTGACCCCGTCTTCTTCTTGCATCACGCAAACACTGACAGGTGAGTCAACGTATTCTTGCTTG
AATAAACAGTTCGTTCTCCTCTTTCATCTTGTCTCTATCGCATCACATTTGAAGACCGGTATCTATC
ATATACTGGGCTGGCCTGCTTATATTCTGTGTGGTCCCGTATAACTTCTTTTGTCTTGGGGTTGGCCA
CGTTTCATATCTTAACGTTCTTCGTGTCTCTGCGGTGTTGGTGGATGTGTTTCACTGTTAAACTGGTTT
GATAATGAAGACCTTTAATCCTCCCTTCCCTTCCATCCCACATGATAGCTGAATCTGAAAAATACTTT
ACTGTTGGTACCTCTGGCTGTCTTGTGTCTATACTCTGCGGATGAAAAATAGGTCCATACTTAGAATA
TTATTTCTACCGGCTTTAATATCTCTAACGATTCGGGGGTTCAAATTGCTGTTTTTGTGTTTACATA
ATTTAGACTTGAACAAATATTTTGGTATGGGTCAATTGTACTTATGGCAGTGTTCGAAAAACAAAA
AAAGAAGTTCAGAGGCGAGATATTCCAATTTGCTTGCCTACCTTATCTCTCACTCCTTGGAAATAGTA
TTGATATCTCTCGTCTACTTGTAAATTTGAGCAAAGGAATCCACCACATGAGT.....
.....**GATTTGGGCCATCTGGCAAGAGCTTACAGCGTTACAGAGGCCTGCCCTACAATGAGG**
CTGACTGCGCCATCAACCTGATGAGAAAACCCCTACAGCCCTTCAACAACGACGAGTTGAACCACGGT
GACCTCACAGCAGATACAGGTGAGAACTCAAGGTGTAATGGGCATGTTTATGATGAGCATTCTATTG
CTAAATAGTGAGAAGCCTACCTGATAATAGCTGAGCACATCTAAAAGTGAAATCGAGCTTTGGAATG
CTCAAACGTTGGCAAATGTTTATCTCTGCCAGATTAGGTCTCATCGGCCATAGCAAAGCCACAAGTC
ATCTTAACTTTTAGTTCTTTAATTTCTCTCTATTTTGTCTAAGTATTTTTACGTTCCGTCTAAGTGTA
TAAGACGTCTTTCGGTGTAAAGCTTCTTTTTTCTATCCTTATTGTCTTCAGAATTTTTAAATATCAG
TTTCTATATCGGCTGTCTTCAAAGTTCAGAGTTGGATTTTGTATTGGATGGAGGTGTGTACATGGA
ATAAAAAAGGGGAAATAAGCGAAGAGAAAATTCGGATTTTTTCTTAAACATTTTTACGTGTGACTA
CTGTTAACATTTATGACTGTATTTTTTCATATTTGAGCTATGTGAATTGAGCTAGATTTTTATCACAT
TATTACGAAGCACCTGTAAAAGGAGTATATTGTAAGGAGTATATTGCAAAGGAGTATAATTA
CAATTTCTTTGATTGAAATTGTTGAAATATGTGTACTACAGTTTTAGTTATAGACTGAGTAAGGCTTTA
CGGCGCTTGCAAAATGCATAAGGTCATATGTTACTATCAGTTTTGAAGTACTTATAAAATGTCTCTTTTC
CAAAATGAATTTTTTCGAAATGTTCTCCCGTTTGCAATGTGCTACCCCGTTTTCTTGTCCAGAATAG
TACAGATCGTAAAGCGCACAAAGTTTGCTTTGGGCGGAGACATGCGCTAAACATATGCTAATTATTA
TTACATCATTTTTCTTTCCAATCACCAG**CCGTC**CCGCGGACAG**CTT**CGACTACCGCAACC**ACTTCCAG**
TACGAGTACGATACGCTCACATTCAACCACATGACGATCCCGCAGTTGGAGAAC**CTTCTGCACCAGAG**
ACAGGAGAACGGCCGTGTGTTTGCCGGCTT**CCTGCTGCACAACATCGGAGCCTCGGCTGACGTGGAGA**
TCTACATCTGTGTGCCTACCGGGCCACGGGGCAAGAAGAACTGCGGAAACAAGGTGCTCATTTACATA
ATAATATATATAGGGGGGATAATAAAAATCCGTATATAATAATTAATAGTATATACATATATATATAT
ATACACACACATATATATGCGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGAGTCTGTGTGTGTGCGTCTGTCTTTTTATATCATCTGTGTCTGAGTGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGACACAGCGGAGTGACTAACTGAGTGAATGAATCAGGGGGTGCAGGACTGAGCAGGGGAC
GTATGTGTATTTGTGTGATCATGCATCTGCTTATAAAATAAATCGGTAGATTGTCTTAGGGGATGGAT
GACGCCCTAGGACGGCGTTGTTTTGGGGTCCCGATGGAGAGGGGGGGACTTACTTCTACCGGAGTCCG
CACAAAGATTCTTCAGTTCTCGGAATATTTATAGCGCAAGAGAGCCTTTTTCTTATTGGAGCGTGTACT
CACTGGATCTA.....AGACTCGTGTGGTGGATCTTATATTGATT
ACGCTTCTATTTCTTTTCACTGTCATCTTCAGTTATGTGTGAGATCATTTC AACATTCTTCTGTACG
AACCTTCCATTTCTTCTTACACCATTTGACCTCATTTTTCTTCTGACCCATCATCAG**CCGGAGTA**
TTCTCCGTCCTTGGTGGACAGCTGGAGGAGATGCCCTTCGTGTTTGACCGTCTCTACAAGTATGACAT
CACGCACGCTGTGAGAGACCTCGGACTTAAACTGGACAACGCTGCCAACTTTGAGCTTAAGATCGACA
TTGCGCAGTCAACGGCAGCTTCTTGAGCCCCAGCATTCTTCCAAGCCCCACTGTTTTCTACGTGCC
GGATCTAGTAAGTCTGATAACCGACAATGTGGGTGGTAGGCGGGTGTCTAATGTGGTTTGCTCCTTC
TTCTTATCAAACATCTATAACCCTGATCTCTCCTCCTTTTATTCTTTGTATGTTACTCTCTACTTGT
ACACTTATATTACCTATTCATTTTGCAAGTGCCGTTAAACTCAAACCTTACACTAAAACGAAACGCCAG
CTTCTTGTGATAATGGCGAAGTCGTTGGCCATTCAAAGCTCAGTCAGATAGAGATCATAGCTTACT
ACAACGAAAACAGAAAGCCCAACAGCGGCCCTTAATAATTGGGAAAAGGCTATATATTACGTTAATT
GGTTGTACATTGTACAGGGCCCAAAAAGCTATCAAATAAACTTAGAAAATGTGAACGCTGGAGTGC
ACCGTTGTGGATCAACTCAAACCTCGATCTGAAAATCGCAGAAAATGGTGTGCTCCAGAACGAACAGAG
CCTGCTGGTAGAAGTGGTTCGTTGTTGAACAGCTAAGGCTAGGGGTCTCTGTGGACGGGGGACACCAGA
ATTGTAGCTTTATTCTATTAGGGAAACATTAGAGGTGAGGATGGTTAGTGGTGGGAGTTTGTACAAGT
GGACTGCTGTTAGAAACCGAGAGAGGAAAAATAGGGCGTTTGTACAGACGAACCTTATCATCGTTTTCT
TTGCATCCAGTTCTTTAGAATGTTTGCACAAGGTATAGTATGAGACTAACAGCCAGGCTCTTTTAAAT
GTAGATTTTTTACACCCCGTTGAAATACATGTAGTTTACAAAAAGTGCTGTAGCCTGCAAAGTTATTT
TTTTACGTTTTTTTATCATCGTTAACAG**ACGAGAGACAGGAGTCAGACGGCCAGTTGAGCTCTTATCA**
GGTGAGAAAGAGCATCGACGCCCTGAGTCTCAGGAGGAGTTGTCCCTCCTGAAAGCCATGGCTGCC

**TTCAAGCCGACAGTTCCGCTGACGGATACCAGTCCATCGCCTCGTTCCATGCCATCCCCCTCTGTGC
CCATGCCCCAGTGCCAGCAAAAAG**

Abb. 53: Genomische Sequenz des Ach2 vom Intron c/d bis ins Exon e1. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, blau: kodierende Bereiche der FU-d und rot: Teilsequenz des Exons e1. Punktierter Abschnitte bezeichnen Intronbereiche, die nicht durchgehend sequenziert sind.

TGGAAAGCAGAAGATGAGAAGTACATAGTAATGACATAGGAGCATATAACCCATTGATGGGAAATTGCC
AACCATGTGGAAACGCTATTACACCACCCTCAGCAGTTAAATACTTTGGTCGTACAATCGTGAGTAGG
GGGGAGTCTTCTTAAAGAGAGATGATAGTGGGGCGATATAAAGAGGCAACGTCTACATCGCAGGAGG
GAGAGGAGAAAGACGAGGGCGGAAGAACTCCTTCGTCTTATTTATAGTACAATAATAATCATGCGGC
AAGGGAACACTCCCCACAGCTATATTCCTCACAAATTAGAAACGTAATTCGTTAGCATAACGCCAAAC
CGCCACACTCGCACAAAACAGAGGGCCAATAAAAGAAAAGACTCAGAATCCCCCTACTGATCGAAACT
CCAAACTATAGTCCCTCCCCACCGCAGGAGAACCACCTTGTGCATGTGTACCTTTGACCTCTACTCGG
ATACAATGATAAATATCCTCGAGTCAACCTCTTCTGTACCCACACCTTACATCTCTTTTCTCCACC
CCCCCTCTCTCTCACACAAATCCATATCTGTCTCACTCTCATTCTGCCTTAATCTCTCACTATCGTAC
TTAAAACCTCTCATTACCGAGCGCGTGTGTATGTATGTGCTGCATATGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGCCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTCTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGAGCGGTGAGCATGTACATGTGTATCTTTTTGCGTATCTAAT
GAGCATCAACTTCAATTCCGTAACAAG**GTGGAGCAAGCCTTGAGGAGACACGGAAGCGCCATCGCTAT
CCCCACTGGGACTGGACTCTGCCCATCACTGACTTGCCTGAGATCTTCACTTCTCAGAACTACTATG
ATGTATGGAGAGATGAG**GTGAGTTTTATCTAGTAGTTATATTAAGAGTTTTACAAAACGTGGCAACGC
AATGGACCACATAAGGCAACCAGTGAACAGAAATTTACCCCGTGAATCGGAGATGTACCGTAGGTAT
CTTTTTAAAGTTTTGCTGACATTGTTTCGATGAACGGACATACAATTTAAACAAATAAAAAAAGACAA
ACTCCGGTTCAAACTATCCAACACATCTTTGCCCGTTTATTGTCCAG**GTGGTCAACAATCCGTTCCGC
CGAGGCTACGTGCCGACTGAGGACGTATACCCGTGCGTGACATCAGGCCTGAGATCAGGAACAAGAA
CCAAGCTGGAGATCACTCGGCCATCTTTGACCTGGTCTCTCAGCCCTGGAGCAGACCGACTACTGCG
ACTTTGAG**GTAAAAGTCTAATTGTGTTTACTATTTGCAACTTTTTGTTTACCTATTGTATAACCTGTG
CACTAAGACCATTACTCGAAAAGAAATTAATAGATTTATGTACAGTCTATTTCTAGAGCAGTGCATACCAA
CTTCAGCGACATCGCTCACAAGAGGGGGATTGATAATTTTGGTGGGCGGTGGAGATCATTTTGGAAAG
TGACTTGTATTATTTAATACCCGCCCACTTGAATGCTTGTAGATGGGCAATACGAAAACCTCCAACC
TCTTAAAGGTGGCAAAACTGGGCGCTGGCTTGATAAAGATTGACAAGCACAGATTTAAAGTCTGTTAA
AACGAGGGGTAAAACAACAAGGTGTTTTTTTATACACACAAGACGAATGTTCCCTTGTTAAAGGGGT
GGAACAAATAAGAATGGGCAAGAAAGTTAATTTTCATGTCCCAAATATGAATCCACCACATTGGAGC
TT

Abb. 54: Genomische Sequenz des Ach2 vom Intron f1/2 bis ins Intron f3/4. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, hellblau: die kodierenden Bereiche der FU-f.

TACATCGCACTGTGGTGCCATTCATGGATTTTTTTTTAGACCACTCGTTGTTCTTTTACAG**GTACATT
TGCCGTGCTGGGCGGCGCCATCGAAATGCCATGGGCCTTTGACCGTCTCTTTAAGTATGACGTCACAA
ACGTGTTTCATGAAGTTGAACCTGCGCCCTGATGACGTGTACCACTTCGAGGTGGAGATTGTGGCTGTG
AACGGCACTCATCTCGACTCCGGACTCATCAGACCTCCAGTGTCCAGTTTGTGCCGGGAGTCAAGGG
TAAGAAAACAATTCGGACTTACAGTCATGCCAGTAAATAGTATATGCTTTAATTGTAGTTTAAAAACT
CGTTAAAGATCTAGCCAGGGGGAGGGGGTCCACTTACCTTACCTATCCCATAGTCTGGCTGGCCG
TTGGGGCACAGCTGTAGATTTTACAACCAGATTCTTCCACTCCTCGTGGTTCTCCACTTTCCGTAGTA
AGATGCTCCAGCCCTGGCCAGTCTATTGTTTAAATGTTGTCTTCCATCGTTTCCATGTCTTCTCTCT
CGTCTCCCTCCTTGTGATGCTCCTTGTAGTAAGGAGGCACTGGATTCAAATTTGCAATCTCAACAAAG
CAGTTTATAATTTGAGAATGTCCCTCCAAAGGGGCCCTATATGCAACAACCTGTCTGAATATACAACAA
CGCTGTGTTTATTCGCTCGCTTCTAAGTATTGATGAACCTTTACGAGAACTTGATTTTTCTAAGTA
ATGTCGAATGCATGGCGTTAGTTGCGAAACCTGTTACCATAACAGTATTATGGGAAGCTTGGGAATG
GTGGAGTTAAAGGTGATTGTGACATTTTTGTTTACTGCTTGTGTTAGATTTTGTCCGAGAGGGGAATG
ATGCTGATGCCAAGCAACTCAGTTTTAGAATTAATACTAATTTCCACATTTACCCTCGAACTATAAT**

GATCAGCAACCACCACTACCTGAGCTCATCAAAGCAGCTGTTAAAAAGCGCTTACCCTGAGCACCAA
 ATAATATCTGTTTCTGTTCCATTTCAGGTTATTACGAGCGTGTGGCCGCAAGACTGCCAAGAGTTC
 TGCCAACCTGCTGAGAAAGGACGTGAACGACTTGACTCTGGCCGAGGTGTCCAACCTGAGAGACGCC
 TGTACAAAATGCAGCAAGACCAGGGCCCCAACGGCTTCGAGGCCATCGCTGGGTACCACGGCGCCCT
 TTCAAATGCCCGGCAGAAGGAGCAGACAAATACGCCTGTTGTGCTCACGGTATGGTTGATACGTCATG
 CTTTGGAGATTGTTTGTGTAATTATGTAAGTAAATCAGATGTGGTGATAGAATTATTGCAAATGTC
 GGTGTTAGTTGCTGATGTTGTTGAATAACACCCTTAAAGACGTAACATTATCTAAATCATCGCTGAAC
 ATTCTGTCTCTCAAAGGAAAACATGGTGAATAAACTAACAGGAACAACAATTAAGATCGACACGGA
 ACCTCGCATCAGGGAAATTTAGCATACTTTAGTCTGTGGTGAATGATTTGGCTCTTTGCCTTGAC
 GCAGAAGACGCAAGTTCGATTCTGGGACGTTTAAAGTTGGAAAACGATTAATAACTTGGCCTTC
 TTGAAAATACAATGTCCTGTTGTCATATTTTGCAGAATAAGAAAATAGTCCAGCCTCCCCAACATC
 TATACTCTTTTAAACCTTTGGCTCCTCCCCCTTCGTCAGGATGCCAATCTTCCCTCACTGGC
 ACCGCTCCACACCGTACAGTTCGAACAATCTCTCAAAGAACACGGAGCTCTGGTGGGCGTGCCCTAC
 TGGGATTGGACCGCCCCATCAATGCCCTGCCTTCTCTGATTGGTGACAGCAGCAATCACAACCGTT
 CTACAAGTCTCACATCTTTTTGTAAATAAGGTGAATAATTACGTTTGAATACACCACAGTGGGATGA
 TAG

Abb. 55: Genomische Sequenz des Ach2 vom Intron g5/6 bis ins Intron h2/3. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, rosa: Exon g6 und blaugrau: die kodierenden Bereiche der FU-h.

4.3.3 Vergleich der Aminosäuresequenzen von Ach1 und Ach2

Ach1 FDYRSSFHVDYDNLEFNGLTVPQLARVLEQNKAEDRVFAGFMLHGIQQSALIKFYIC
 :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: ::::::::::::::
 Ach2 FDYQTNFHYEYDALEFNGLSVPQLARVLEQNKAGDRVFAGFMLHGIQQSALVKFYIC

Abb. 56: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons c6 von Ach1 (oben) und Ach2 (unten) zeigt eine Identität 86.0%.

Ach1 HLYGQEYREALTTASQVRRDLSTLNEGEVESLRAAFLSIQKDDTYANIAAFHGKPLCELNGR
 .:::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: ::::::::::::::
 Ach2 QLYGQEYREAVTAASYVRRDLSTLNEGEVESLRAAFLSIQKDDTYANIAAFHGKPLCELNGR

Ach1 KVACCVHGMATFPAWHRLYVEQ
 :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: ::::::::::::::
 Ach2 KVACCVHGMATFPAWHRLYVEQ

Abb. 57: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons d1 von Ach1 (oben) und Ach2 (unten) zeigt eine Identität 95.3%.

Ach1 VEEALLGRGSNVAVPYWDWTKPITELPKLINDATYFNSRTQKFEPNPFSSGKVLGEDAVTT
 :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: ::::::::::::::
 Ach2 VEEALLGRGSNVGFYWDWTQPITELPKLINDATYFNSRTQKFEPNPFSSGKVLGEDAVTT

Abb. 58: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons d2 von Ach1 (oben) und Ach2 (unten) zeigt eine Identität 95.1%.

```

AcH1 DPQAQLFNNDHFYQOTLFALEQTNFCDFEIQFELIHNLHLSWLGGRAEYSFSSLDYTAFDPVF
    ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AcH2 DPQPQLFNNDYFYQOTLFALEQTNFCDFEIQFELIHNLHLSWLGGRAEYSFSSLDYTAFDPVF

AcH1 FLHHANT
    :::::::
AcH2 FLHHANT

```

Abb. 59: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons d3 von AcH1 (oben) und AcH2 (unten) zeigt eine Identität 97.2%.

```

AcH1 IWAIWQELQRYRGLPYNEADCAINLMRKPLQPFNNDDELNHGDLTSRY
    :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AcH2 IWAIWQELQRYRGLPYNEADCAINLMRKPLQPFNNDDFNHGDATNRY

```

Abb. 60: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons d4 von AcH1 (oben) und AcH2 (unten) zeigt eine Identität 91.5%.

```

AcH1 RPADTFDYRNHFQYEYDTLTFNHMTIPQLENLLHQEQENGRVVFAGFLLHNIGASADVEIYICV
    ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AcH2 RPADTFDYRNHFQYEYDTLTFNHMTIPQLENLLHQEQESGRVVFAGFLLHNIGASADVEIYICV

AcH1 PTGPRGKKNCGNK
    ::::::::::::
AcH2 PTGPRGKKNCGTR

```

Abb. 61: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons d5 von AcH1 (oben) und AcH2 (unten) zeigt eine Identität 96.1%.

```

AcH1 AGVFSVLGGQLE-MPFVFDRLYKYDITHAVRDLGLKLDNAANFELKIDIRAVNGSFLSPSILP
    ::::::::::: :::::::::::::::::::: . . . . .
AcH2 AGVFSVLGGQLEEMPVFDRLYKYDITRAVRDLGLRPSGAKFDLKINIHAVNGSYLNPSLLP

AcH1 SPTVFYVPGS
    . . . . .
AcH2 APTVLYVPGS

```

Abb. 62: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons d6 von AcH1 (oben) und AcH2 (unten) zeigt eine Identität 79.5%.

```

AcH1 ERQESDQQLSSYQVRKSIDALSPQEELSLLKAMAALQADSSADGYQSIASFHAIPPLCPC
    ::::::::::: ::::: . . . . .
AcH2 ERQEADQVGNLVRKNIASLSPQEELSLLKAMAALQADSSADGYQSIASFHAIPPLCPS

AcH1 PSASK
    ::::::
AcH2 PSASK

```

Abb. 63: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons e1 von AcH1 (oben) und AcH2 (unten) zeigt eine Identität 86.2%.

```

AcH1 VEQALRRHGSAIAIPYWDWTLPTDLPEIFTSQNYVDVWRDE
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AcH2 VEQALRRHGSAIAIPYWDWTLPTDLPEIFTSQNYVYVWRDV

```

Abb. 64: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons f2 von AcH1 (oben) und AcH2 (unten) zeigt 95.2% Identität.

```

AcH1 VVNNPFARGYVPTEDVYTVRDIRPEIRNKNQAGDHS AIFDLVLSALEQTDYCDFE
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AcH2 VVNNPFARGYLPTEDVYTVRDIMPEVRNKNQAGDHS AIFDLALSAMEQTDYCDFE

```

Abb. 65: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons f3 von AcH1 (oben) und AcH2 (unten) zeigt eine Identität 90.9%.

```

AcH1 TFAVLGGAIEMPWAFDRLEFKYDVTNVFMKLNLRPDDVYHFEVEIVAVNGTHLDSGLIR
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AcH2 TFAVLGGAIEMPWAFDRLEFKYDVTNVFRKLNLRPDDVYHFEVKIMAVNGTELYPGLIR

```

```

AcH1 PPSVQFVPGVK
      ::::::::::
AcH2 PPSVQFVPGVK

```

Abb. 66: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons g6 von AcH1 (oben) und AcH2 (unten) zeigt eine Identität 89.9%.

```

AcH1 YYERVAAKTAKSSASVLRKDVNDLTLAEASNLRDALYKLQQDQGPNGFEAIAGYHGAPFK
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AcH2 YYERVAAKTAKSSANLLRKDVNDLTLAEVSNLRDALYKMQDQGPNGFEAIAGYHGAPFK

```

```

AcH1 CPANGEDKYACCAH
      :::: ::::::
AcH2 CPAEGADKYACCAH

```

Abb. 67: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons h1 von AcH1 (oben) und AcH2 (unten) zeigt eine Identität 91.9%.

```

AcH1 MPIFPHWHRLHTVQFEQSLKEHGALVGVPYWDWTAPINALPSLIGDSSNHNPFYKSHISFVNK
      ::::::::::::::::::::::::::::
AcH2 MPVFPWHRLHTVQFEQALKEHGALVGVPYWDWTAPINALPSLIGDSSNHNPFYKYHISFVNQ

```

Abb. 68: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Exons h2 von AcH1 (oben) und AcH2 (unten) zeigt eine Identität von 93.7%.

4.3.4 Über gPCR amplifizierte Ach-Sequenzen

GAGGTCAACGACCTTAGACAGGCCCTAACGAAGTTCCAGGTACGTATATTCCTAAACAACACTCATT
 AGCTTAGCTCAGCGACAGCAGAGGAAACAAGAACAGCAGTAACAAAAGCAATAGCGTAAAGTCAGACC
 ACAATTTTGAATTAAGAATTAACAAAAATTAATCTCAGCTCCCTAATCTGTATTATCTGTTGCATGT
 GTTCAAGAAATGTTTTGCCGAAATTCGAATTTTAAATTTTGAAAAAAAGCAAGAAAACATACAAGAC
 GTAGGAAAAATGTCAAAAGAATGAAACAGTTCTTTCTCTCTTATGCAAAATATGCTTTCTGGCTTGA
 CACGAAATAAATATGAACAGCTTGGGAACAAGAAGCATCATGATTATCCTCAACAACATCAGTAACGA
 TAGGGTTTtagcttGTAGCAGTTCAAACTTTAATTGTCTCATAATGTGTACCTTCACTTAACATAACC
 GATTGAACTAAGGTGCATGTCTAAAGAGGAAAGCGAAGAGAAATCAAGATCCGGTTGTCCATCTGTCC
 TCAGAAATGACGCCAGCGTGGACGGCTACCAGGCCATAGCAGAGTTCCACGGAGACCCGGGCAAATGTC
 CTTACCCCAACGCCAAGAACCGACTGGCCTGTTGTATCCACGGCATGCCACCTTCCCTCACTGGCAC
 AGGCTCTTTGTCTGACAG

Abb. 69: Klon „Aplysia A1“ umfasst die Gensequenzen vom Exon b1 bis ins Exon b2. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, rot: Teilsequenz des Exons b1, blau: Teilsequenz des Exons b2.

GAGGTCAACGACCTTAGACAGGCCCTAACGAAGTTCCAGGTACGTATATTCCTAAACAACACTCATT
 AGCTTAGCTCAGCGACAGCAGAGGAAACAAGAACAGCAGTAACAAAAGCAATAGCGTAAAGTCAGACC
 ACAATTTTGAATTAAGAATTAACAAAAATTAATCTCAGCTCCCTAATCTGTATTATCTGTTGCATGT
 GTTCAAGAAATGTTTTGCCGAAATTCGAATTTTAAATTTtGaAAAAAAGCaAGAAAACATaCAAGAC
 GTAGGAAAAATGTCaAAAGAATGAAACAGTTCTTTCTCTCTTATGCAAAATATGCTTTCTGGCTTGa
 CACGAAATAAATATGAACAGCTTGGGAACAAGAAGCATCATGATTATCCTCAACAACATCAGTAACGA
 TAGGGTTTtagcttGTAGCAGTTCAAACTTTaTTGTCTCATAATGTGTACCTTCACTTAACATAaCC
 GATTGAACTAAGGTGCATGTCTaAGaGGAAAGCGaAGAGAAATCAAGATCCGGTTGTCCATCTGTCC
 TCAGAAATGACGCCAGcGTGGaCGGCTACCAGGCCATAGCAGAGTTCCACGGAGACCCGGGCAAATGTC
 CTTACCCCAACGCCAAGAACcGACTGGCCTGTTGTATCCACGGCATGCCACCTTCCCTCACTGGCAC
 AGGCTCTTTGTCTGCaCAGGTGAGAGAAATATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCAT
 ATCAT
 CATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCGGGCTTCCCTCAGGAACATTCACAGTATAAATGACAAG
 AATCTAGATCTACACATAGTGTA AAAACGAAAGTGCGTACATACATGTCACAACACTTAAAGGAGCGG
 TGAGTACAAATCGCAAAGACCAGAGAGAAGGGAACACAAAGGCCAGAGAGGTGTATCTTTATAGGGAG
 TGGGCTTTGATGTCCCTTTTCCAAAATCAGTTTTATGATTTAACCAGACGTTCTCTACTAATTTTGT
 ATGAGGAAATGCCTTATGCATTCTGTGTTTTCTGGATACAAAGGAAGACAGTTCTCTCATTGTATA
 CCCATAGTCTATGTTTCCTATATCAATCACGCGATTTGGGCTACAATCGAGAAGAACAACGCTCAAG
 TTAACAGACACATAAGAAATCAGTTTACTGCTGTCAAAATTATGTACAGGCACATTCAACATGACTTT
 AAAATGCTAAATATTTAAAGAACTTTGCTAAGTTTCAAACGTACAGGAACGTTTCCCAAACAACGGAT
 ATTGTAAGCGAATTGCGAAGGAATTATAAACTGCTTTTGAATTTTTGCATGTGCAGTTTGAAGATTCA
 GTTCCATGGGAGAAAGACGTTAAGTCCCGATGTTCTTCCCTTAAATATCTTTACAGTGTGCAAATC
 CTTACCTGAGCAGTTTGAAGATTCAGTTTTGCGTGGAAAAGACATTAATTTCTGAGTTTATCCTTTTA
 AAAATATATTTACAATGTTGAAAACCTTACCTGGGACGTTGGAAGATTCCGGTTCCATGGGAGAAAGAG
 GTCCTTCCCTCTTAAATATACCTACGGTGTGCAAATCCTTTCAGTGTTGTTATTCTTTATACAATTA
 TTTTATATAAAAATTCATTTTTAGGTTGAAGATGCACTTCGTCGTCGTGGCGCCAGATTGGTATCCCG
 TACTGGGACTGGACCAAGCCTGGCACTCAGATTCCTGCCCTGGCTGCTGAGGAGACTTACGTTGATCC
 AGAG

Abb. 70: Klon „Aplysia F13 MP6“ umfasst die Gensequenzen vom Exon b1 bis ins Exon b3. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, rot: Teilsequenz des Exons b1, blau: Exon b2, lila: Teilsequenz des Exons b3.

GGACGTGCTGAGTACTCGTTCTCCTCTCTCGACTACACTGCTTTTGACCCCGTCTTCTTCTTGATCA
 CGCAAACACTGACAGGTGAGTCAGCGTATTCTTGCTTGAATAAACAGTTCTTCTCCTCTTTCATTTT
 GTTCTCGACTGCATCATATTTGAAAACAGGTATACTGGGTCGTCCTGCTACGTTTCTCTGTTGGTCAC
 GTTTAATGTTTCAGGGCCCTGTATGTCTTGCACTGTAGGAAGATGTGTTCCAAGGTTAATAAACGTAAT
 GTCGGAGAAAACCTCGTGGGGCGAGCGGGCAGCAGGAGATCTTCAGAGGAAGAACCCCTTCCAGCAAG
 ATTTTCGGCCTTAACATAATTGTTCCACGATTAATAAACATAAGAAACAATTTGATCATAAAAACCCCA
 ATCCTCACTTTCCACGAAATATTTTTATCTGAAAAGGCTTGACTGTGCAATGCGTTGGTCGGCTCTTG
 TCTTTACTCTGCGAATGAACAAAAAATCTTCACTATTTCTTCTGGCTTTACTATTTCAAGAGAGATTT
 CAAATTGCAGTTTTAATTTTTGCCTAACTGGAACATCTGTAATTTGACTTGGGCAATGGACTTGCTAT
 TACCAATAATCTTATATCCCTACTACTGCTATTAATAACAATACGTGATTCAGAGAAAAGTTAGTGAAAT
 AGTCTCTAATAGTGCAAAAAAGGTCTGCCGATTTTTGCAAAAAAATAATCTCCTGAGGCCGATTAGT
 TAGTAAGCTCAGGCTCATCATAGATGCCAAGCATTTCAGGTGACACGACGTTTCGGTGAGTTGTCAC
 TGGGATGTGTCCTTGTGCAAGACACGATAACCCCTGGCTAAAAATAAAACAAGACAAACTAAAACAAAC
 TAAAACAAAAACATGGCGCTACAAAGCGGTGACCACCAATTGTATAAAACACCTTATAAACCCCTGGGC
 TCGTAAAATTACTACTGATTTCTTTTTCTGTATCTGTGTCCAGGATTTGGGCCATCTGGCAAGAGCTG
 CAGCGTTACAGAGGCCTGCCCTACAACGAGGCTGACTGCGCCATCAACTTGATGAGAAAACCCCTACA
 GCCTTCAACAACGACGACTTCAACCACGGTGACGCCACAAACAGATACAG

Abb. 71: Klon „Aplysia D3/4“ umfasst die Gensequenzen vom Exon d3 bis ins Exon d4. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, rot: Teilsequenz des Exons d3, blau: Teilsequenz des Exons d4.

GATTTGGGCCATCTGGCAAGAGCTTCAGCGTTACAGAGGCCTGCCCTACAATGAGGCTGACTGCGCCA
 TCAACCTGATGAGAAAACCCCTACAGCCCTTCAACAACGACGAGTTGAACCACGGTGACCTCACCAGC
 AGATACAGGTGAGAACTCAAGGTGTAATGGGCATGTTTATGATGAGCATTCTATTGCTAAATAGTGAG
 AAGCCTACCTGATAATAGCTGAGCACATCTAAAAGTGGAAATCGAGCTTTGGAATGCTCAAACGTGG
 CAAATGTTTATCTCTGCCAGATTAGGTCTCATCGGCCATAGCAAAGCCACAAGTCATCTTAACTTTT
 AGTTCTTTAATTTCTCTCTATTTTGCTTAAAGTATTTTTACGTTCCGTCTAAGTGTATAAGACGTCTTT
 CGGTGTAAGCTTCTTTTTTCTATCCTTATTGTCTTCAGAATTTTTAAAATATCAGTTTCTATATCGG
 CTGTCTTCAAAGTTCAGAGTTGGATTTTGTATTGGATGGAGGTGTGTACATGGAATAAAAAAGGGG
 GAAATAAGCGAAGAGAAAATTCGGATTTTTTTCCTTAAACATTTTTACGTGTGACTACTGTTAACATTT
 ATGACTGTATTTTTTTCATATTTGAGCTATGTGAATTGAGCTAGATTTTTATCACATTATTACGAAGCA
 CCTGTAAGAGGAGTATATTGTAAGGAGTATATTGCAAAGGAGTATAATTAACATTTCTTTGAT
 TGAAATTGTTGAAATATGTGTACTACAGTTTTAGTTATAGACTGAGTAAGGCTTTACGGCGCTTGCAA
 ATGCATAAGGTCATATGTTACTATCAGTTTGAAGTACTTATAAAATGTCTCTTTTCCAAATGAATTTT
 TTCGAAATGTTCTCCCCGTTTGCAATGTGCTACCCCGTTTTCTTGTCCCAGAATAGTACAGATCG

Abb. 72: Klon „Aplysia G1“ umfasst die Gensequenzen vom Exon d4 bis ins Intron d4/5. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, blau: Teilsequenz des Exons d4.

GTGTTCTAATGTGGTTTGCTCCTTCTTCTTATCAAACATCTATAACCCTGATCTCTCCTCCTTTTATT
 CTTTGTATGTTACTCTCTACTTGTAACTTATATTACCTATTCATTTTGAAGTGCCGTTAAACTCA
 AACTTACTACTAAAACGAAACGCCAGCTTCTTGTGATAATGGCGAAGTCGTTGGCCATTCAAAGCTCAG
 TCAGATAGAGATCATAGCTCTTACTACAACCTGAAAACAGAAAGCCCAACAGCGGCCTTTAATAATTGG
 GAAAAGGCTATATATTACGTTAATTGGTTGTACATTGTACAGGGCCCAAAAAGCTATCAAATAAACT
 TAGAAATGTGAACGCTGGAGTGCGGACCGTTGTGGATCAACTCAAACCTCGATCTGAAAATCGCAGAAA
 TTGGTGTGCTCCAGAACGAACAGAGCCTGCTGGTAGAAGTGGTCGTTGTTGAACAGCTAAGGCTAGGG
 GTCTCTGTGGACGGGGGACACCAGAATTGTAGCTTTATTCTATTAGGGAACATTAGAGGTCAGGATGG
 TTAGTGGTGGGAGTTTGTACAAAGTGGACTGCTGTTAGAAACCGAGAGAGGAAAATATGGGCGTTTGT
 ACAGACGAACTTATCATCGTTTTCTTTGCATCCAGTTCTTTAGAATGTTTGCACAAGGTATAGTATGA
 GACTAACAGCCAGGCTCTTTTAAATGTAGATTTTTACACCCCGTTGAAATACATGTAGTTTGACAAAA
 AGTGCTGTAGCCTGCAAAGTTATTTTTTTCAGTTTTTTTATCATCGTTAACAGACGAGAGACAGGAGT
 CAGACGCCAGTTGAGCTCTTATCAGGTGAGAAAGAGCATCGACGCCCTGAGTCCTCAGGAGGAGTTG
 TCCCTCCTGAAAGCCATGGCTGCCCTTCAAGCCGACAGTTCCGCTGACGGATACCAGTCCATCGCCTC
 GTTCCATGCCATCCCCCTCTGTGCCATGCCCCAGTGCCAGCAAAAG

Abb. 73: Klon „Aplysia H” umfasst die Gensequenzen vom Intron d/e bis ins Exon e1. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, rot: Teilsequenz des Exons e1.

ACGAAAGACAAGAGGCTGACGGCCAGGTCGGAACTACCTTGTGAGGAAGAACATCGCTAGCCTGAGT
 CCCCAGGAGGAGTTGTCTCTCTCGAAAGCCATGGCTGCCCTGCAAGCCGACAGTTCCGCTGACGGATA
 CCAGTCCATCGCCTCCTTCCACGCCATCCCCCTCTGTGCCCAAGCCCCAGCGCCAGCAAAAAGGTATT
 TAGAAGGTTTTGATAACAATGATATTGGTATTTTCGTTTTTCAGGGAACGAAAAGCAACAAACAGTAAG
 GAAGAAACGTGTGGTTACCAAGTGTCCCTACAGAGGGGCAGGAGGAAAAGAAAACACGATTGTAGTTAC
 TGAAGACAACATTCTGAAGTAACTGAAGTACACAAATTAAGCAAATCTTCAATAAGAAAATGTTTGCA
 ATCAGTCCCTTGCCAGAATG

Abb. 74: Klon „Aplysia I” umfasst die Gensequenzen vom Exon e1 bis ins Intron e1/2. Schwarz und kursiv: Intronsequenzen, rot: Teilsequenz des Exons e1.

GGAAACAGGACACAGTCTTCTCTTTAGCTATATGGCATTGAGCACCACCTTCTTGCATTAAGTGGCTG
 TATTTTGGGGTCATATTTTCGATTGGACTATGAGATATGTGGTGGAGTTGAAACATTTGTTGTTTTATT
 ATTTATTTTAAAAAATCATTTTTTGGAGTCAAGACTCAGATTTCTTGTTCATGGCTTATTTTTTTACCCCC
 CCCCCCCCCCATTTATTATTAATATTTTTTTCATGAACACATTGATTATTGCCAGAAAAGCACTTAAGA
 TGGCATAACGCTAAAACACTTTCTAGGTTTTACAAAACACTGCACAAATTTATGAACCCCAAAATATTG
 TCTTTCTTACAGCCTTTTCTCTTTGACATTGGAACGAAATTGTATCACCTGATATAGCCGTTTGGCTC
 CAGAGAACTGAGATTGTTAACTCTGAGACATTAGACTCATAATTGTAATGAAATAAATGCCGCTCTT
 GTTATTCAAATGATGGTGCATTATGCCTTACAAATTGTAATATTAAGAGGATACACTCAATGACTGGT
 GCCACGTTGAATGTTAAAGAAAAAACAACACGTGTAACATTTCTATGAGAGTGTATGATGTTTCTTG
 TGAAATGGAATAATGTCTTATTGCTCATGTATAATGCTATAACCAAGCTCCAATGTCCATTCAAAATG
 TAATGCTTTGCGATTTAAAAAAACCACCAAAAACCAAGAGAGAAAGAGAAACATTTCTGAGTCTGC
 GACGTTTACATAGCCCTGTTTGGCAGAATACTGTTATTGTTTGTAGACATAGTTTATT

Abb. 75: Klon „Aplysia K” umfasst eine Teilsequenzen der 3’UTR.

4.3.5 NCBI-Trace Archive TI-Nummern (Accession-Number) der Gensequenzen des *Aplysia californica*-Hämocyanins

AcH-Isoform 1				
Genbereich	Accession-Number		Genbereich	Accession-Number
Intron 5'UTR1/2	gnl ti 1149484621 gnl ti 1180223458		d6	gnl ti 1806700592
5'UTR2/Signalsequenz 1	gnl ti 1152216419		e2	gnl ti 1181963057 gnl ti 1118756650
Intron Signalsequenz 1/2	gnl ti 1153680365		e3	gnl ti 1118756650 gnl ti 1188220907
Signalsequenz 2/a1	gnl ti 1175646325		e4	gnl ti 1162294932
a2	gnl ti 1113932126		Intron e4/5	gnl ti 1181965944
Intron a2/3	gnl ti 1152208409		e5	gnl ti 1159351373
a3	gnl ti 1155604938		e6	gnl ti 1162220670
a4	gnl ti 1115641933		f1	gnl ti 1150875630
a5	gnl ti 1159552696		Intron f3/4	gnl ti 1159197333
Intron a5/6	gnl ti 1175651487		f4	gnl ti 1161730026
a6	gnl ti 1149867498		Intron f4/5	gnl ti 1174530365
b1	gnl ti 1155597312		f5	gnl ti 1187196567
b3	gnl ti 1149804601		f6	gnl ti 1157029474
Intron b3/4	gnl ti 1149263718 gnl ti 1149470281		g1	gnl ti 1159642159
b4	gnl ti 1078103189		g2	gnl ti 1149721486
b5	gnl ti 1093017297		Intron g2/3	gnl ti 1161739051
Intron b5/6	gnl ti 1155605723		g3	gnl ti 1164251618
b6	gnl ti 1149809991		Intron g3/4	gnl ti 1149851884
b7	gnl ti 1149261052		g4	gnl ti 1186109762 gnl ti 1159343865
b8	gnl ti 1149468859		g5	gnl ti 1161180911
c1	gnl ti 1149799864		g6	gnl ti 1161786484 gnl ti 1165862997
c2	gnl ti 1188115343		h1	gnl ti 1152698160
c3	gnl ti 1154246155		h2	gnl ti 1151885675
c4	gnl ti 1146188114		h3	gnl ti 1149748831
c5	gnl ti 1159702184		h4	gnl ti 1151728132
c6	gnl ti 1149795613		h5	gnl ti 1165247199
c7	gnl ti 1164077423		h6	gnl ti 1151880863
d1	gnl ti 1154245604		h7	gnl ti 1093024327
d3	gnl ti 1803972296		h8/3'UTR1	gnl ti 1159367751
d5	gnl ti 1807116990		3'UTR2	gnl ti 1162244182 gnl ti 1809137067

AcH-Isoform 2				
Genbereich	Accession-Number		Genbereich	Accession-Number
c6	gnl ti 1162340517		f2	gnl ti 1161185976
d1	gnl ti 1142905831		f3	gnl ti 1150284909
d2	gnl ti 1185474311		g6	gnl ti 1151730105
d3	gnl ti 1159376228		h1	gnl ti 1165781605
d5	gnl ti 1159146748		h2	gnl ti 1155353086
d6	gnl ti 1149776180			

4.4 Sequenzen der *Haliotidae*

Die aufgelisteten Nukleotidsequenzen umfassen Teilsequenzen der FU-f und FU-g, inklusive der Linker-Intronsequenzen (kursiv). Das Exonende der FU-f und der Exonanfang der FU-g sind blau markiert.

Haliotis asinina

CCGTTTTTTCTGAAGTTGTCTGTGGTTGCTGTGAATGGGTCTGTTATCCCACCGTCTCTCCTTCACCA
 GCCAACAAATAATTTATGAACCAGGCGAAGTAAGTAGTGTTCTTTACATACTGTGAAACATTTTTCTGA
 ACGAATACAATGGAATAACCAAAAATTGACACTGATAGAAAGATATACTTCTTTCTGAATTCATCTCT
 CATCGGTTTGCCTAAGCCAAAATAGACATGTCACCGCTATGCGTGCCTTTCTGAATCCTTTCCGAG
 GCCCTTGTTATGTTTCTAATATGTACAAAATACGTATAAAAGTTCTTTATCGATAGAATACCCCATAC
 AGGATGTACAGAGTCACATTCTGTTAACATAGATCATCATGAGGATCACGAGTCGGGAAGCATTGCA
 GGATCTGGGGTCCGCAAGAATGTCAACACCCTTACAAAGGCTGAGACTGACAACCTTAGGGAAGCACT
 TCGAGGTGTAATGGACGACCATGGTCCCAATGGTTTTCAAGCCATTGCAGCT

Haliotis corrugata

GCATTTTACCTGAAGGTTTCTGTGGTAGCTGTGAATGGCACTGTCCTTCCACCGTCACTTCTTCATGA
 GCCAACAAATACTTTATGAACCAGGCGTAGTAAGATATCTAAAATATGAGCTTTATGCCAAGACAGTT
 CGTGTTCACTTACATACTGGTTTGTGTTGTAATACTACAAATGAAAAATGGGGGGGGGGGGGGGAAC
 AAAGAATGTGATGTTATTTTATGGTATATAACTGAGTGAAACACTAAATAAACCTTGCATGAAAGGAT
 ATGCTTCATTTTAAAAGTGTGTCTCATTACGATTTCTGGACTTATCATGTATCATCTGTAAAACAAA
 CTATATTAGTCATTGCCTTTTAGGCCTAATTGAATCTGTTTTGGAGACTGATTATTTTCTAGCGTTAT
 GTCAATTTCAAACGTAAAACATGGGATATCAAGTGTGTTTCATCTGTAGAATATCTTAGCAAACTTGA
 CAGGGTCACATACTGCTTCAATATAGTCATCATGAAGACCACGCGTCCGGTAGCCTAGCAGGATCTG
 GCGTGCGAAAGGACGTAAACACCCTCACAACAGCTGAGACTGAAAACCTGAGAAGAGCTCTTCAAGGT
 GTAAAGGAAGACCATGGTCACAACGTTTTTCAAGCGATTGCTGCT

Haliotis cracherodii

GCATTTTTCTGAAGGTTTCGGTTGTAGCTGTGAATGGCACTGTCCTTCCACCGTCACTTCTTCATGA
 GCCAACAACTTTATGAACCAGGCGT **AG** GTAAGATATCTAAAATATGAGCTTTATGCCAAGCCAGTT
 TGTGTTCTTTACATACTGGTTTGCCTGTTAATACTACAAATGAAAAAAGGGGGTGTACCAAAGAAT
 GTGATGTTATTTTATGGTATATACTGAGTGAGACACTAAATCAACCTTACATGAAAGGATATGCTTC
 ATTTTATAAGTGTGTCTCATCACGTTTTCTGGACTTCATGAATCATCTGTAAAACCAAAAATATATTAG
 TCATTGTCTTTTACGCCTAATTGAATCTGTTTTGGAGACTGATTATTTTCTAGCGTTATGACTTTTAC
 GAACGTAAAACATGGGATAAAAATGTATTCACCTGTAGAATATCTAAGCAAACCTGATAGGGTCACA
 TACTACTTCAATATAG **GT** CATCATGAAGACCACGAGTCCGGTAGCCTGGCAGGATCCGGCGTACGAAA
 GGACGTAAACACCCTCACAACAGCTGAGACTGACAACCTGAGAAGAGCTCTTCGAGGTGTAAAGGAAG
 ACCATGGTCACAACGGTTTTCAAGCAATTGCTGCT

Haliotis discus supertexta

CCGTTTTTCATCAAAAATATCTGTGGTTGCTGTGAATGGGACTGTCATCCCATCGTCTCTCCTTCACCA
 GCCAACAAATAATTTTGAACCAGGTGA **AG** GTAAGATATCTGATAAATGGATTTAGTCCAGAAACAATG
 TGTCTTTTACATGCAGTGAATAAATTTCTGAACCTTATACGTTGGAATAACAAAACATGGCATTGTTAA
 AGAATACGTTTTTCTTTGTGAACCTAATCTCTCGTCAGTTTTATTGACCCAAACATATATTAGGCATGA
 CACTACTAAGTGTCTTTTCTGAATCAGTCTCATAGCTGGTGTATGTTTCAAATAATCGCAACATAT
 GTATAAAGGTTCTTTATCGGTAGAATACACTATGCAGGATTTACAGGGTCACATCCTGTTTAAATATAG
AT CATCATGATGACCACGAGTCTGGAAGTATAGCAGGATCTGGCGTCCGTAAGGACGTGAACACACTT
 ACAAAGGCCGAAACTGACAACCTGAGGGAAGCACTTCGAGGTGTTATGGACGACCTTGGCCCTAACGG
 CTTTCAAGCTATTGCTGCT

Haliotis diversicolor

CCGTTTTTCATCAAAAATATCTGTGGTTGCTGTGAATGGGACTGTCATCCCATCGTCTCTCCTTCACCA
 GCCAACAAATAATTTATGAACCAGGCGA **AG** GTAAGATATCTGAAAATGGATTTAGTCCAGAAACAATG
 CGTTCTTTATATGCTGTGAATAAATTTCTGAACCTTATACGTTGGAATATCAAAAAAATGGCATTGTTA
 AAGAATAAGTTTTTCTTTCTAATCTCTCGTCAGTTTTATTGACCCAAACATATATTAGGCATGTCACT
 ACTATGTGTCCCTTTCTGAATCAGTCTCATAGCTGGTTCTTTATCGGTAGAATACACCATGCAGGATT
 TACAGGGTCACATCCTGTTTAAATATAG **AT** CATCATGATGACCACGATTCCGGGAAGTATAGCAGGATCT
 GGCGTCCGTAAGGATGTGAACACTCTTACAAAGGCCGAGACTGACAACCTGAGGGAAGCACTTCGAGG
 TGTTATGGACGACCATGGCCCTAACGGTTTTCAAGCTATTGCTGCT

Haliotis fulgens

GCATTTTTCTGAAGGTTTCGGTTGTAGCTGTGAATGGCACCGTCTTCCACCGTCACTTCTTCATGA
 GCCAACAACTTTATGAACCAGGCGT **AG** GTAAGATATCGAAAATATGAGCTTTATGCCAAGGCAGTT
 TGTGTTCTTTACATACTGGTTCGCTGTAAATGCTACAAAGGAAAAAAGGGGGTGGGGTAACAAAGA
 ATGTGATGTTATTTTATGGTTTATACTGAGTGAGACACTAACTCAACCTTTCATGAAAGGATATGCT
 TCATTTTAAAAGTGTGTCTCATCATGTTTTCCGGACTTATCATTGATCATCTGTAAAACCAAAAATAAA
 TTAGTCATTGCCTTATACGCCTAATTGAATCTGTTTCCGACACTGATTATTTTCTAGCGTTATGTCTA
 TTACAAACGTAAAACATGGGATAAAAAGTGTATACATCTGTAGAATATCTTAGCAAAACTTGACAGGG
 TCACATACTGATTCAATATAG **GT** CATCATGAAGACCACGAGTCCGGTAGTCTAGCAGGATCTGGCGTA
 CGAAAGGACGTAAACACCCTCACAACAGCTGAGACTGACAACCTGAGAAAAGCTCTTCAAGGTGTAAA
 GGAAGACCATGGTCACAACGGTTTTCAAGCAATTGCTGCT

Haliotis gigantea

GCATTTTTCTGAAGGTTTCGGTGGTAGCTGTGAATGGCACCGTCTTCCACCGTCACTTCTTCATGA
 GCCAACAACTTTATGAACCAGGCGT **AG** GTAAGATATCTAAAATATGAGCTTTATGCCAAAACAGTT
 TGTGTTCTTTACATACAGGTTTCGCTTGTAATACTATGATGAAAAATGGGGAGGGTGGGTAACAAAGA
 ATGTAATGTTATTTTATGGTATATAACTGAGTGAGACACTTACATGAAAAGGATATGCTTCATTTTATA
 AGTGTGTCTCATCACGTTTTCTGGACTTATCATGTATCATCTGTAAAACCAAATATATTAGTCATTG
 CCTTTTACGCCTAATTGAATCTGTTTTGGAGACTGATTATTTCTAGCGTTATGTCTATTACAAACGT
 AAAACATGGGATAAAAATGTTTTCATCTGTAGAATATCTTAGCATAAAGTACAGGGTACATACTGC
 TTCAATATAG**GT**CATCATGAAGACCACGAGTCCGGTAGCCTAGCAGGATCCGGCGTACGAAAGGACGT
 TAACACCCTCACAACAGCTGAGACTGAAAACCTGAGAAAAGCTCTTCGAGGTGTAAAGGAAGACCATG
 GTCACAACGGtTTTTCAAGCAATtGCTGCT

Haliotis hannai

GCATTTTTCTGAAGGTTTCAGTGGTAGCTGTGAATGGCACCGTCTTCCACCGTCACTTCTTCATGA
 GCCAACAACTTTATGAACCAGGCGT **AG** GTAAGATATCTAAAATATGAGCTTTATGCCAAAACAGTT
 TGTGTTCTTTACATACAGGTTTCGCTTGTAATACTATGATGAAAAATGGGGAGGGTGGGTAACAAAGA
 ATGTAATGTTATTTTATGGTATATAACTGAGTGAGACACTTAAATGAAAGGATATGCTTCATTTTATA
 AGTGTGTCTCATCACGTTTTCTGGACTTATCATGTATCATCTGTAAAACCAAATATATTAGTCATTG
 CCTTTTACGCCTAATTGAATCTGTTTTGGAGACTGATTATTTCTAGCGTTATGTCTATTACAAACGT
 AAAACATGGGATAAAAATGTTTTCATCTGTAGAATATCTTAGCATAAAGTACAGGGTACATACTGC
 TTCAATATAG**GT**CATCATGAAGACCACGAGTCCGGTAGCCTAGCAGGATCCGGCGTACGAAAGGACGT
 TAACACCCTCACAACAGCTGAGACTGAAAACCTGAGAAAAGCTCTTCGTGGTGTAAAGGAAGACCATG
 GTCACTACGGTTTTCAAGCAATTGCTGCT

Haliotis midae

CCATTTTTCTGAAGCTGTCTGTGGTTGCTGTGAATGGGACTGTCATTCCATCGTCTCACCTTCACCA
 GCCAACAAATAATTTATGAACCAGGAGAA **AG** GTAAGATATTTGGAAAATGGATTTTGTCCAGAAACGCTG
 TGTCTTTTTGATGCTGTGAAACATTTTCTGAACGATTACAGTGGAAATAACCAAAAAACTGACATTAAT
 TAATAAAAATATACTTCTTTCTGAAATTATCTCTCGCCAGTTTTGCTGACCCAAACATATATTTGG
 CTTGCCACCGCTATGTTTGAAGTTTCTGAATCTGTTCCAGAGACTGGCGTTATATTTCTAATAATAGCA
 AAATATTGTATAAAGGTTCCCTTATCGGCAGAATATCCCATGCAGGATTTACAGGGTACATCCTGTTT
 AATATAG**GT**CATCATGATGACCACGAGTCGgGAAGCATAGCAGGATCTGGCGTCCGCAAGGACGTGAA
 CACCCCTTACAAAAGCTGAGACTGACAACCTGAGGGAAGCACTTCAAGGTGTAATGGACGACCATGGTC
 CCAATGGCTTTCAAGCCATTGCTGCT

Haliotis rufescens

GCATTTTTCTGAAGGTTTCGGTGGTAGCTGTGAATGGCACCGTCTTCCACCGTCACTTCTTCATGA
 GCCAACAACTTTATGAACCAGGCGT **AG** GTAAGATATCTAAAATATGAGCTTTTATGCCAAGACAGT
 TTGTCTTCTTACATACAGGTTTCGCTTGTAATACTACAAATGAAAAATGGGGGGGGGGGGGGGACA
 AAGAATGTGATGTTATTTTATGGTATATAACTGAGTGAGATACTAAATCAACCTAACATGAAAGGATA
 TGCTTCATTTTATAAGTGTGTCTCATCACGTTTTCTGGACTTATCATGTATCATCTGTAAAACCAAAA
 TATATTAGTCATTGCCTTTTACGCCTAATTGAATCTGTTTTGGAGACAGATTATTTCTAGCGTTATG
 TCTATTACAAACGTAAAACATGGGATAAAAATGTATTCATTGGTAGAATATCTTAGCAAAACTTGACA
 GGGTACATACTGCTTCAATATAG**GT**CATCATGAAGACCACGAGTCCGGTAACCTGGCAGGCTCCGGC
 GTACGAAAGGACGTAAACACCCTCACAACAGCTGAGACTGACAACCTGAGAAAAGCTCTTCGAGGTGT
 AAAGGAAGACCATGGCCACAACGGTTTTCAAGCAATTGCTGCT

Haliotis tuberculata

CCATTTTTCTGAGGCTGTCGGTTGTTGCTGTGAATGGAAGTGCATTCCACCGTCTCATCTTCACCA
 GCCAACGATAATCTATGAACCAGGCGAAGGTGAGATATATGCAAATTGAATGTTGTCCAGATGCGTTG
 TTTACATTTATATGCTTGGAAATTGTCCTGAACGAATACAGTGGAATAACCAAAAGCTGAAAAATAAAA
 AGATATATACTTCATTCTGAATTTGTCAGTATTGCTGACCCCAAAACACGTTATCCATGTGCGACACTA
 TATTTGCCTTTCTGAATCTGAGACTGCGTTATGTTTCTAATAATCACGAAATATGGTATACAGGTTACT
 TTATCTGTAGAATACCCAAGGCAGAATTTAAAGGGTCACACCCTGTTTAATACAGATCACCATGACGA
 CCATCAGTCTGGAAGCAGAGCAGGATCCGGGGTCCGCAAGGACGTGAACACCCTGACGAAGGCTGAGA
 CCGACAACCTGAGGGAGGCGCTGCGGGGTGTCATGGCAGACCACGGTCCCAATGGCTTTCAAGCTATT
 GCTGCT

Haliotis wallalensis

GCATTCTTCCTGAAGGTTTTCGGTTGTAGCTGTGAATGGCACCGTTCTTCCACCGTCACTTCTTCATGA
 GCCAACAAATACTTTATGAACCAGGCGTAGGTAAGATATCTAAAATATGAGCTTTATGCAAAGACAGTT
 TGTGTTCTTTACATACTGGTTTTGCTTGTAAATACTACAAATGTAAGGGGGGGGGGGGACAAAGAACGT
 CATGTTATTTTATGGTATATAACTGAGTGAGACACTAAATCAACCTTACATGAAAGGATATGCTTCAT
 TTTATAAGTTAGTCTCAAACGTTGTCTGGACTTATCATGTATCATCTGTAACCAAAAATATATTAG
 TCATTGCCTTTTACGCCTTATTGAATCTGTTTTGGAGACAGATTATTTTCTAGCGTTATGTCTATAAC
 AAACGTAAACATGGGATAAAAATGTATTCATTTGTAGGATATCTTAGCAAAACTTGGCAGGGTCACATA
 CTGCTTCAATATAGTTCATCATGAAGACCACGAGTCTGGTAGCCTGGCAGGATCCGGCGTACGAAAGG
 ACGTAAACACCCTCACAACAGCTGAGACTGACAACCTGAGAAAAGCTCTTCGAGGTGTAAAGGAAGAC
 CATGGTCACAACGGTTTTTCAAGCAATTGCTGCT

4.5 Sequenzen der Polyplacophoren**4.5.1. Genomische Sequenzen der FU-f bis FU-g**

Die aufgelisteten Nukleotidsequenzen umfassen die genomischen Sequenzen von der FU-f bis zur Kupferbindungsstelle A („WAIWQ“) der FU-g, inklusive der Linker-Intronsequenzen (kursiv). Das Exonende der FU-f und der Exonanfang der FU-g sind blau markiert.

Acanthochiton fascicularis

ATGCCTTGGTCATTTGACAGAACATTTAAATACGATATCACCGGAGCTCTCAAGAAGCTAGGCATATC
 CCTTCGAGATGAACGATTCACTTTCGAAGTTCCATCGTTGCTGTTAATGGCACAGAATTACCCGATG
 ACATCATAACCAGCCCCGACGTTCTCATATGTACCTGCCGTAGGTGAGTCGCTGTTTTACAAGTCGTCG
 TTTATTCAGCACAACTAATCGTGTACTGGCTGTGATTTGGGTTAAACTAGGTTTCTTAAACTACTTGT
 AATTAATTATTATCTTTTTTAAAGCAATCTCTCACTCCGTTGTACGTTTTTTTTGTCTAATATCGACT
 TTTGACTCTACTTACAAACCGTATAACTAAAAGAGTGTTCCTCCTTATTGGTGATGTGAGTTTTCCCA
 TTTACAGCTGCAAGGCGTCACGTTGGATCTGACCATGCTGGGGCACCTGGCATTAGGAAGAAGTAGA
 CGATTTGTCCCCATCCGAAATAGAGAACCTGCGAGAGGCTTTGCGACGTGTGCAGGAAGACACATCAG
 AGCACGGTTACCAGGCGATTGCTGCTTACCACGGCCCTCCAGCCCAGTGTATGAATCCGAGTGGCACT
 GATACGATGGCGTGCTGCTTACATGGTATGGCGAACTTTCCACACTGGCACAGGCTCTACACAAAACA
 GATGGAAGATGCCCTTGCCTAAAAGGAGCCCGCCTGGGAATTCCTTATTGGGACTGGACACAGCCCT
 TTACGAGTCTGCCTTATCTGGTGACCGAAACAGAAAACAACCCGTTCTTCCGAGGGGAAGTGGCATA
 TTAAACCAGTACACCTCTCGAGACCCAGTGGAGAACCTTTCCGGGATCCTGAGTTCGGCGAGAAGTC
 ATTTTCTATCGCCAAGTTCTCTTCGCATTAGAGCAGACAGATTTCTGCGACTTCGAGATTCAGTTTG
 AGGTGAGCCACAACGCCATCCACTCGTGGGTGGAGGAGTCTCTCCATATCCATGTCCACATTGCAT

TACACCTCATAACGACCCGCTCTTCTATCTCCACCACTCCAACACGGACAGGCTCTGGGCAATATGGCA
AGC

Callochiton bouveti

TGGGCGATGTGGCAGGCTTTGCAAAAACACAGGAAACAACCATAACAACAAAGCTTATTGTGCATCAGA
GCAGATGACAAAGCCGATGAAACCATTTCAGCTTTGACGATAAGTTCAACCTGAATTCTGTACGAGGG
CGCATGCACGACCAGACAGTGTATTCGATTACGAAAAACTGGGTTATACATACGACGATCTGAAATTT
GATGGAAAGAGTATATCTGAACTCCACGATATAGTTGAGAGACGGAAACAGAGTGATAGAGTTTTTCGT
AAACTTCCTGTTACATGGGATGGGGACCTCGGGTGATGTACATTTCTCAGTGTGCAAAACAGACGACG
ACTGTGTCAAAGCAGGCCTGTTTTTCATCCTCGGAAGTGACCTGGAAATGCCCTGGGCATTTGACAGA
AACTTTAAATACGACATCACTGCTGCACTTAAGAAATTAGGCATCGTTCTTGATAAAGACCCCTTCTT
CCTGAAGATCGCTATTGTTGCCGTCAATGGCACCACGCTGTCTAATGATGTAATCCCGACACCAACTC
TGTCTACGTCCCAGCAGCAGGTAAGATGACGTTTTTCGTTGTCTAAATCAATATATAAAGGACTTAAT
CAGTAATAAAGTATAATGTATATGATACCACAAAAACACACCTCATATTTAAAATGACTTACAGAAA
GTTGTTCTTCCAAATATGTTTACTGTTTTGTTGTTTTAACAGGGCGAGTCGGCAAGAGGGGGCAGAT
CGTGCTGGTGCTCCTGGGATTTCGAAAAACGTCAACGCCTTGTCTCCTTCTGAAATCGAAAATCTCAG
AGATGCCCTTCGCAAGGTGATGGAAGACGGATCTGAGCGTGGATACCAGGAAATTGCTTCATACCACG
GATTACCTGCCAAGTATAACACCCCGACGGTCAGTCCATGGCATGCTGTTACATGGCATGGCTAAC
TTCCCCACTGGCACCGACTGTACACCAAACAGATGGAAGATGCTCTCGTTCTGAAAGGAGCCAGGCT
TGGAATACCTTACTGGGACTGGACAGTGCCATTCCAAAGTTTGCCTCATCTAGTAACCGACACAGATA
ACAACCCTTTCTATCAGGGCGATGTGGCATTATGAACACAAAGACCAGCAGAGACCCCGTACCAAT
CTCTTCCAAGATCCTCAGTATGGCGAAAAATCGTTCTTTTATCGACAGGTTCTCTTTGCATTGGAACA
AACCGATTATTGCGATTTTCGAAATTCAGTTTCGAAATGAGTCATAATGCCATTCATTCTTGGGTGGGAG
GCTCATCTCCGTATTCTATGTCCACTCTGCATTACAGTCATATGACCCCTTTTCTACCTTCATCAT
TCCAACACAGACAGGCTGTGGGCAATATGGCAAGC

Cryptoplax iredalei

ATGCCATGGTCATTCGACCGAACATTCAAATATGATATCACGGGAGCCCTGAAGAAACTCGGCATAGC
TCTGAGAGACGAAAGATTTCAGCTTCAAAGTATACATCGTTGCTGTCAACGGGACGACATTACCCAATA
CCGTCATTGAAGACCCGACATTAACCTTATGTGCCTGCCGTAGGTGAGTTAAACTTACTTATCTCCTTT
ACATTGCGCAACAATAAGTTACCTTTTATAAAAAAATAGATATCACAATTTTCATTGAAGAACGGATG
TAGCTTTCATACTCATTGATAGCCTGCGGCGCGTAGTTTGTAGGTAGCGTCGCAGACTGCGGATCA
GAAGGTCAACTACTGACTCTCCGTCATATAAGTGGTATACTCTGGAGTACGGCCTAAAACAACAATCA
ATGAAATCAATCTTTTTCTTGGGGCCTTGGTGGAGAGTTGGACGACGGCGCGCAGTAGTACCGTAAAA
ATGGGCTGCTCTCGTTGGAGTCTTCTGCCCCTCACCGCTGAGTTCATGTGGGAAAGTTGTCAGTGAC
TTGCCAATGGTCAGTGGTTTACCCCTGTTTCTCCGGGGGTTTTCTTTCATCCGGGGTACTCACAAC
TACTGACCGCCGTCAAATACTCTTGAGTACGGCGTATAACAACATTCAATCTATCATTTTGTGTTTTA
CAGCTGCGAGGCGTCAGGTTCAATCTGACCATGCTGGTGCACCGGGAATCCGGAAAAACGTGAACAAT
TTGTCTCCATCTGAAATAGACAACCTGAGAGATGCTTTGCGTAAGGTACAGGCCGATTTCATCCCGCG
GGGCTACCAGGCCCTGGCCGCTTATCACGGCCTACCACCCAGTGCAGGACGCCAGATGGCAGCGACA
CCATGGCCTGCTGTGTCCATGGCATGGCCAATTTCCACACTGGCACAGACTCTATACAAAGCAGATG
GAAGACGCTCTTGCCTTAAGGGAGCGAGATTGGGCATCCCACTGGGACTGGACGCAACCTTTTAC
TAGCCTCCCCTACCTCGTGACAGAGACGGAGAACAATCCTTTCTACCAAGCGGATGTGGCTTTTCGTCA
ATGAGCACACCACGCGAGATCCGGTAGAAAACCTTTTCCGTGATCCGGAGTTTGGCGAAAAATCGTTC
TTTTATCGCCAAGTCTCTTCGCATTAGAGCAGACCGATTTCTGTGACTTCGAGATCCAGTTCGAGGT
GAGCCACAACGCCATCCACTCATGGGTTGGAGGGACATCTCCCTACTCCATGTCCACGCTACATTACA
CCTCATATGACCCGCTCTTCTACCTTACCACACTCAAACACAGACAGGCTGTGGGCAATATGGCAAGC

Hanleyella oldroydi

TGCCGTACTGGGATTGGACCACTGATGCCCGACTGCCTTCTATTCTCTCCGATGAGAACTATTACGAT
 GCCTGGCAAGACAGTGTCTTTGAGAATCCTTTCATGAGAGGAGAAATCAAACATGAGCAGACGTTTAC
 TGCTCGCGATGTACAGATGGATTTGTTTCGCGACAGGTCTGATGAACACTCTGCTCTCTGGCACCAGG
 TATTTTTAGCATTTGAACAGGAAGATTACTGCGATTTTGGAGTGAATTCGAAGTCGCTCACAACACC
 ATCCATTATCTAGTTGGAGGTAGACACGAATATTCTGTATCCTCCCTTTCTATACGTCTTACGATCC
 TATCTTCTACCTTCATCACTCCCAGGTTGACCGACTCTGGGCAATGTGGCAGGCACTACAAAAGTATC
 GAAAACAGCCATACAACAAAGCTTATTGTGCCTTAGAACAGATGACCAAACCAATGAAACCGTTTACG
 TTTGATGGGAACCTCAACCTAAATCTATCACACACGATCATCAACACCAAACCTCCGTATTTGACTA
 TGAGGGCTTGGGATATACATACGATGATCTCAAATTCGACGGGCATAGCATCGCTGAATTAGACGAAA
 TGATTCAGACAAGCAAAAATAGTGACAGGATTTTCGACGGCTTCCTTCTTACGGTATTGGAACATCA
 GCCGACGTTCAATTTCTCGTATGTACCAGCGAGAACCCTGTGTCAATGCAGGCCTCTTCTTTGTCTT
 GGGAAAGTGATCTAGAGATGCCATGGTCGTTTCGACCGACTCTACAAATCCGATATTACTCACGCCGTCC
 AGAGTTTGGGTTTGAATCTGGAAGATGTGTTTACAGCTCAAGAGCCATTTTACCTCAAACCTGAAAATC
 GTTGCTGTTAATGGGACGGTTCTGCCATCTAGCGCCATACCAGCACCTACACTGATTTACGAACCAGC
 TAGAGTACGTTATCAATAATGTAAAGGGGAAGCTCGGGAATGATGCCATTATCTTGCTTGGAAATGAA
 ATCTGGCCCAGGGACGTAAAAGGTTTAAAGGTTTCATGTCGTCATTGATAGTAATAGTCAATTTAGGCT
 TCATTTGATATCGTAGATTATCTTTGCAAGGAAAAAAGACCCCATATTATATTAGTCTAGTTATTAGA
 TATTCAAATGAATAAATAAACCCTGAAAATGTGGAATATTAGTTCTGACCAATTATTTAATAGTGTT
 TCGTTTATCGTCACGGATCTGACTCTTGTGTTTGTATTCTTTACTCTATTAAGGTACCCTGAACATC
 AGGAAGGAGATCACACAGGAGGTCCTCGGGGTGAGGAAGAATGTGGACAGCTTAACCCCTTCAGAAATT
 GATAGCCTTCGAGATGCTCTTCGACAGGTCCAAGAAGACACAGGGCCACGAGTTTTCCAAGCCATTGC
 AGCTTATCACGGTCTACCGCCAATGTGCAAGAGCGCTGACGGCACTAAAACACTAGCTTGCTGTGCTC
 ATGGTATGCCAACCTTCCCCACTGGCACAGACTGTACACGAAACAGATGGAGGACGCCCTAGCAAGT
 AAGGGTTCTCGCGTGGGTATTCCATACTGGGACTGGACCGAGGCGTTCACTGCCTTGCCCTCGTTGGT
 GACAGAATCTGAGAACAATCCTTCTACCAAGGAGATATCACCTTCATGAATACACACACGACCCGAG
 AACCTTTCGACTATCTGTTTAAAGGATCCAGAATACGGAGAGAAGTCATTCTTCTATCGACATACGCTA
 TACGCTCTAGAACAGACGAACTTTTGCATTTTGAAGTCCAATTTGAGATGAGCCACAACACCATTCA
 CAACTGGGTTGGTGGAAAGTCAACCTTCTCCATGTCTACACTGGACTGCACCTCATAACGACCCCTGT
 TCTTCTTACCCTCCAATACTGACAGGATCTGGGCGATATGGCAGC

Lepidozona interstincta

ATGCCATGGTCATTTGACCGAACATTTAAATATGATATCACTCCCACCTAAAGAAATTAGGTGTGTC
 CCTGCAGGAAGACCTATTTTCATCTGCAATTGAGTATTGTGGCCGTCAACGGAACAGCTTTGTCTGCTG
 ATGTGCTCCAGCTCCTACACTGACGTTTGAACCCGCTGGTGGTAAGTCGTTCTTCTGTTATGTGTGT
 AACATATTCTGGTAAAACCTCATTAAAATTGTCATCTTGATTTCCCAAGTAAATGCTTACTATCTATT
 TTAAATAACTGAATAAATGATAATTCTGACTTATGAATAGGAACCTCATGAGACTCCGCTTGAATTTGA
 TTAACTCTCTGCAGTGTCTCCGGAGCAGGGTATAACATTTTCTTAGTCTTCATTTTATCTTCTTCCAA
 ACATATATGTAACCTGTGTTTTCTTTCCGCCAGCTCCGACGGAAAGACAGAAGAAGACCCATGCCGCA
 GCCCTTGGAAATAAGGAAGAATGTCAACGAATTATCTTCATCTGAAATCGATAACCTACGAGACGCTTT
 GCGTCAAGTACAAGCTGACTATTCATCGCGCGGTTACCAGGCAATCGCTGCTTACCACGGTGTGCCAG
 CCAAATGCAGAACACCTGACGATAGTGATAACAATGGCTTGCTGTCTCCATGGCATGGCTAACCTCCCT
 CATTGGCACAGGTTGTACACAAAACAAATGGAAGATGCCCTAGCTCTCAAAGGGGCTCGACTTGGAAAT
 GCCTTACTGGGACTGGACGCAGCCATTCAAGAGCTTACCTTACCTCGTTACTGAAACCCAAAATAATC
 CGTTTTACCAAGGACAGGTTGTCTTCAAACACACCTTACCACCAGACATCCTGTGTCTAAACTCTTC
 AAAGATCCTGAATTTGGCGAGAAGTCATTCTTCTACCGCCAAGTACTCTATGCTTTGGAACAAAGAGA
 CTTCTGTGACTTCGAAATCCAGTTTGAAGTTAGCCATAATGCCATCCACTCCTGGGTAGGAGGTTCTT
 CTCCTTATTCTATGTCCACTCTCCATTATAACCGCTTATGACCCACTATTCTACCTTCATCATTCAAAT
 ACGGACAGGATCTGGGCAATATGGCAAGC

Lepitochitona cinerea

ATGCCATGGTCATTCGACCGAACATTCAAATATGACACTACGGGAGCTGTGAACAAATTAGGTCTCTC
 TTTGGGCGAAGATAGCTATTACCTAGACGTCAGCATAGTCGCTGTCAATGGAAGTGAATTGTCAAACG
 ATGTTCTACCTGCACCAACCCTCAGCTACGTACCTGCCACATGTAAGTCTACTAAGCCGTTATATTTT
 GTCGCTTTTACAGTTAATGTTTAAAGGGAGAAACATATGTACATATAACCTTGTCTCCATGGGTATTTT
 AGACAAGAAGATTTTCCATGCAAAGTGTGTTTTAGTGTTCAAATATATATACATATATATATAGTTCT
 GTAATGTTGGTTGATCTAGTGTATCCATCTCTAGATACCAGATATTCGCTTAATGAGCACTTTCTTT
 TATCTGTTTTTACGCAATCCAGCCGTCGCGAAGAAGGTGACCTTGTCCGGTGCTCCCGGAATAAGGAAGAA
 TGTGGATGATTTGTCACCGTCCGAAATAGAAAATCTTAGAGATGCTTTAAGACAAGTTCAAGAAGATA
 CTTCTGAACGTGGTTTCCGGGCTATTGCTGCTTACCATGGTCTCCCGGCACAATGTATGACTCCTGAT
 GGGGAAGATAACCATGGCTTGCTGTGTCCACGGAATGCCAACTTCCCACATGGCATCGGCTGTACAC
 TAAACAAATGGAAGATGCTCTTGCATTGAAAGGGGCAAGACTAGGAATACCGTACTGGGACTGGACAC
 AGCCGTTCAAAAACCTTCTTATCTCGTCACTAGTAATGATAACAACCCATTTTATCGGGGAGAGGTT
 TCTGATGGTATCTACACGACCAGAGATCCCGTGACCAATCTTTTTAGAGATCCACAGTTCCGGCGAAAA
 ATCTTTCTTCTACCGCCAAGTACTATATACTCTAGAACAGACTGATTATTGCGATTTTGAATCCAAT
 TCGAAGTTTACACAATGCTATTCATTCTTGGGTAGGCGGTGAATCGCCTTATTCTATGTCGGCGCTT
 CATTACACCTCTTATGACCCGTTGTTTTATCTCCATCACTCCAACACCGATCGTTTTGTGGGCAATATG
 GCAAGC

Leptochiton alascensis

TGGGCGATGTGGCAGGCACTACAAAAGCACCGAAACCAACCATAACAACAAGGCTTATTGCGCATTAGA
 ACAGATGTCCAAACCAATGAAACCCTTCAGTTTCGACGAAAATTTCAACCTAAATTCTGTCACACATG
 ATCATTC AACACCAAACTCCGTGTTTGATTATGAAGGCCTTGGTTACGCTTATGACAACCTCGAATTT
 GACGGACACAGCATCGCTGAGCTGGACGACATGATTCGTGTATCGAAAAATAAGGATAGAATATTTGC
 AGCATTCTTCTTACGGTATCGGCACATCGGCCGACGTCCATTTCTCTGTGTGCACCAGCGCTGACC
 ACTGTGTCAAAGCCGGTTTTATTCTTCGTTCTGGGAAGCAATCTGGAGATGCCTTGGGCGTTCGACAGA
 CTCTACAAGTACGATATCAGCCATGCTGTCAAGAATCTTGGTTTAGATCTTGAAGATGTTTTCCAAGC
 CCAGGAGCCATTTTACCTCAAACCTTGACATCGTTGCTGTTAACGGAACCGTCTTCCATCCAGCGCCA
 TACCAGCACCAACTCTAATTTATAAGCCAGCAGCAGGTACGAAATTCATAATTAAGATCAATATATCG
 TATACGAGTACTCAGTCGGTGTCTGAGATCAACCATTGACATTATTAACCTAACACTGGCTAACTTA
 CACCATGGTCAAAATCACTGAAAAAAAATATGAATTACGCCCATGTAATTAATTAATTAATTAATTA
 AATGCTCAGGAAGGAAATTACACTATCATATCGTGTATTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 ATAAACAGTCCCAGTCTGTAATTGTAATGACATTAAGCTTATATGTGCAACGAATGTCTTGTACCTTC
 ACAGTTGATGGTTGGACGTGAATAACTCTCATGTCAGTATAATGGGCGATGATTGGCTTGTGGATGTC
 AAATTTGACGCTTGTAAATGTTTATCCTTTATATTCTATATTAGCTACCGCCATCATGAAGAGGGAGA
 TCATACCGGAGGCTCTGGGGTAAGGAAGAAGCTTGATAGCTTGACCCACCGAAATTGCAAATCTTC
 GAGATGCTCTCCGACAAGTCCAGGAAGACTCACCGTCTCATGGATACCAGGCACTTGCAGCTTATCAT
 GGGCTACCACCAATGTGCAAGAGCAAAGACGGTACAACAACCCCTGGCTTGTGTGCCCATGGTATGCC
 AACCTTCCCCCACTGGCATAGGCTTTTCAAAAACAGATGGAAGACGCCTTGGCACTTAAGGGAGCTC
 GAATAGGAATGCCGTATTGGGACTGGACCACGCAGTTCAAGGCATTGCCTTCACTTGTGACGGAAACT
 GAAAACAATCCGTTTTTGAAGGAGATATAAAAATTTATGAACATAAATTTACACACAACCCGAGATCC
 TATGGACTATTTGTTAAGGATCCGGAATTAGGAGAGAAGTCTTTCTTCTACCGACATGTGTTGTATG
 CCCTAGAACAGACGATTTTTGTGATTTTGTGATCCAGTTTGTGATGAGTCACAACACTGTTTATAAC
 TGGGTAGGTGGTTCGTCAAAGTTCTCCATGTCAACACTCGACTACACCTCGTATGATCCTCTCTTCTA
 TCTCCACCACTCTAATACAGACAGAATCTGGGCAATATGGCAAGC

Lorica volvox

ATGCCATGGTCATTTGACCGAACATTTAAATACGACATTACAAGCACAGTGAAGAAATTGGGTTTTGGC
 ATTAATGAAGACCAATTCCTACTTAGAGTTAAGAATTGTTGGAGTCAATGGCACAGTCCCTGTCAAACG
 ACGTTCTCCAGCACCCACTCTGACCTTTGTGCCCGCCTCTCGTAAGTATATTCTGTTTTTTTTATTTT
 AGCCACTTAACACTCTCCCTGTGCAACATTTACATACAGTAACGAAACTACAGAGTAGCAAAATTA
 GATATCTTAATGCATGTTAGCTTGTAAATCTTAATGGGATGGCAACATGACTGGAACGATGAACATGT
 GAACTACAGATGATCAGAGAATATAAAATGTTATGAAATAATCTTGATTATAAAGTAAGAATGATATG

CATGTCCTCTCTTCTTCGCAGGCCTGGACGACATGCTGAAGCCGATCATGCTGGTGCCCCAGGAATA
 AGGAAGAATGTTAACGATTTGTCTTCATCAGAAATTGAAAATCTACGACAAGCTCTGAAGAAGGTGAA
 AGAGGATTATTCCCTCACGCGGTTTTTCAGGCTATCGCATCTACCATGGCTTGCCAGCAAAAATGTACTA
 CACCTGATGGTAGTGACACTGTAGCTTGCTGTCTCCATGGTATGCCTGCTTTCCTCACTGGCATCGC
 CTGTACACAAAGCAAATGGAAGATGCTCTTGCCCTAAAAGGAGCTCGCCTTGAATAACCATATTGGGA
 TTGGACAATGCCATTCACAAGTCTGCCCTTCCCTTGTTACCGAAACTCATAATAACCCATTCCACAATG
 GAAACATTGTCTATAAGAATGCGTTCCTACTACCAGGGATCCAGTGCCCAATCTATTTCAGAGACCCAGAG
 TATGGCGAGAAATCCTTTTTCTATCGCCAAGTACTTTACGCTCTGGAACAAACAGATTTCTGTGACTT
 CGAAGTACAGTTTGAGGTTAGCCACAATGCCATCCACTCCTGGGTAGGCGGCCCTTCTCCATACTCTA
 TGTCAACTCTACATCACACGTCATATGACCCACTCTTCTACCTCCATCATTTCCAATACCGACAGGcTG
 TGGGCAATATGGCAAGCC

Loricella angasi

ATGCCATGGTCATTTGACAGAACATTTAAATATGACATCACCAGCGCATTGAAGAAGTTGGGAGTTGA
 TTTGGTTAAAGACTTATTCATATAGAAATCACCATTGTGGCCGTGAACGGAACAACACTGTCCAATG
 ATGTTGTCCACCACCCACATTAACCTTCGTTCCAGCTTCCTGTAAGTCTACATTTAGGAAGTTTTTC
 TGAAAGAAAAAATAGTTTCCCCAGTAACTGGGTATGCTGGTGTAAAGGTGATGATTTTCTTGAGTA
 TGGCAGTCATCACCAATTGATAACCTGTAACCTATTACTTAAAAAGACTTATTTACAGTAGAAGGCA
 TAATATATATACCGATCTCTCGCTCAATCAATACCAGTGGCCAAGTGGCCTAAGGAGCTCGTCTGAAG
 ATCACTGTAGCCTCTTACCAATGAGGTCACCAGTTTAAATCCGGCTTTCCGATGGGTTTGTCTGTGAC
 CTTAAGTCGGAAAAGTCTGCCAATAACTTGTTCGGTACTGCCAGTTTCCACCCACGATAATACTGGC
 TGCCCTTCGTATAAGTGAATATTTCTTGAGTACGGCATAAAAAGGATAATCAATCAATCAACCAATGCTA
 TAATTAATGACAATGGACAAAACCACACATGTGCCAGGAATTGAATCTAAGCATCAATTCCAGCATTCCG
 TATACCACTCGTCAACCAAAAAAGACCTTTCCAGGTGGTTAATCACAAGACCTTTCCCGCCGTTA
 CAGTTATTAAGAATGGGGCGGACATAAAGACAATCTTACCCCATGAATACTTAGCGGCTTAACACCCCG
 AGTTAGGTGGGGGTGTGGCCTGATCACTTACCTCTGACATCTGTTTGGCCACCGGGTTAACACCCCG
 AAGCCCGCCGAGGCCCGAAGGAGGGGTTTTGGGGTGACGAGGTGGCAAACAGACGTCAGAGATGAGT
 GGTACACAACCTATCACTGATACGATGGTTTTAAGCTCCATTCTACCCTGAAAAAAAAGTACGCTT
 GAAAAGTCTGGGCACATTCAGGTTCAAGTCGACGCATTGGTTTTGTTCGGCAAACAAGAACTAGTT
 CAGGAAAGAACTTTTAAATTAGTACTTTGATGACCCATGTACTTCTGTTGAACACAGAAGTGTATTG
 TTTGTAAAAGTATGTGTAAATTCGTTTTCAACATATTTTTGTGTGCATTGTTGTTGTAAAGGGAGGAAA
 TTGTGGCTGCGACACACAGCAAGCAGTGGTAGTTGCCTCACCATCACCTCACGCGCTTCAACGTATTT
 ATTTGTATTTGCACACCCGCACTCAACGGGAAGAGTGGTAGAACTGTAGACCAGACCGTTCTCGTTCTC
 ACTTTCACTGTGAAAATTATATTGACTCAGGTGTATGTGAAAACCTACTAACTGATGAACATGTATCG
 AAGATCAATTGAAATAACCAAAATAGTTTTTTTCTTCTTTGTACAGCTTCCGGCAAACAAGCCGAGG
 CAGACCATGTGCTGCACCAGGAATAAGGAAGAATGTGAATGAGTTATCTTCATCCGAAGTTGAGAAT
 CTTTCGAGATGCTCTGAGAAAAGTCCAGGCTGATTTTTTTCATCCCAAGGTTACCAGGCTATTGCTTCCTA
 TCATGGAATGCCCCCAAATGTAGGACCGCTGATGATAGTGATACCATGGCTTGCTGCCTCCATGGAA
 TGGCCAACCTCCCTCACTGGCATCGCCTCTACACAAAACAGATGGAGGATGCTCTCGCCCTCAAGGGA
 GCTCGTATTGGAATACCATACTGGGACTGGGCAATGCCGTTCAAGCTTACCCTACCTTGTACACAGA
 AACTCAAATAACCCATTCTATCAAGGAAACATTGTCTTCAAGAATGCCTACACAACAAGAGATCCAG
 TGCCCAACCTCTTCAGAGATCCTGAATATGGAGAGAAATCATTTCTTCTACCGCCAAGTCTTGTACGCA
 TTAGAACAGACAGATTTCTGTGACTTTGAAATCCAATTTGAAGTGAGTCACAACGCTATCCACTCGTG
 GGTAGGCGGATCCTCGCCATATTCATGTCAACCCTTCACTACACATCTTACGACCCACTTTTCTTCC
 TCCATCATTTCTAACACAGACAGGCTTTGGGCTATATGGCAGGC

Nierstraszella lineata

TACCGTATTGGGATTTGGACGACTGATCCCCATGTACCATCCATCGTCACAGATCCGAATTATTACGAC
 GCCTGGCAGGACAGCGTATTCGAGAACCCGTTTTCGAGAGGTAAAATCACACACGAAGATACGTACAC
 TGGCCGTGATGTTTCAAGTTGAACTGCTGGAAGTAGGTGCTGATGGCGTACACTCGGCTCTCTGGCACC
 AGGTGATGCTAGCCTTCGAGCAGGAGGACTACTGCGATTTTCGAGGTGCAATTTGAAGTGGCTCACAAT
 TCCATCCATTATCTGGTAGGAGGTAGACACATATATTCCGTGTCGTCGCTTTCCTATAACAGCATAACGA
 TCCAATCTTCTACCTCCACCACTCACAGGTAGATAGGTTGTGGGCAATATGGCAAGCACTACAGAAGC
 ACCGACACCAACCATAACAACAAAGCTTACTGCGCCTTGAACAGATGTCCAACCTATGAAACCATTC

AGTTTCGACGGAAGCTTCAATCTCAATTCCGTAACACATGAGCATTTCGACACCAAACCTCCGTATTTCGA
 CTACGAAAGCTTAGGGTATACATATGATAGCCTCGAATTTGATGGACATAACCATCGCCGAGTTAGACG
 ATCTTATTCAAACAAGGAAGAACAGAGACCGGGTATTTCGCAGCATTCCCTTCTGCATGGTATCAAACA
 TCAGCCGACGTTTCAATTTCTCTGTGTGTACCAGCGAGGACCCTGCACCGCAGCTGGCTTCTTCTTCAT
 CCTGGGAAGCGAGCTGGAGATGGAATGGTCGTTTATAGACTCTACAAGTTCGACATTACACATGCCG
 TGGAGGAGCTAGGTCTACACCTGAAGACCTGTTCAAAGCACAGGAGCCATTTTACCCTAAACTGGCC
 ATTGTTTCTGTTGACGGCGATGCCCTTCCATCCAGCTCTATAACCAGCGCCTACCATAGTTTATCAACC
 AGCCTCAGGTATGTAAGAATTATTGTA AAAACATCTGGACTTTGGGGAATTTGGATTATAACCAACA
 TTAGCAAATTATGGTTGTATTATCCTTGCTGCCGTCTGACGCAGTCGCTGAATATTTTGGATTAGGAAC
 CAGTCGTGAAAAGTGA AAAAGTGAATCTGCAGCCAAACCATAATCATTGTCGAGTCTGTAACAGTAAAT
 CTCTATTTTCTCCATATAAAATTAATCATTGTCGAGTCTGTAACAGTAAATCTCTATTTTCTCCCAT
 ATAAATTAGTTAATTACACTGGTGACCAATAGTCAACTTTGGCTGTCGTTTAAACTTGAATTTCCCCA
 TTCCACTCTGTTTGTCTAGGAGCTGAGCATCATGTTGAGGGCGATCATTTCGAGCGGATTTTCCGTCAG
 GAAAAACATACATAGCTTGACTACATCAGAAATTGAAAGCCTTCGTGACGCTCTTCGACGGGTTCAAC
 AAGACACTTCGCCACATGGATAACCAGGCCATCGCGTCGTATCACGGTCTACCTGCCATGTGCATGAGC
 AAGGACGGTACTACCACCTTGGCTTGTGTACCCATGGTATGCCATCTTCCACACTGGCACAGACT
 CTACACAAAACAGATGGAGGACGCACCTTGTGTATGGGAGCTACCATTGGAATGCCGATTTGGGACT
 GGACGGAGAAGTTTGGCCCTTGGCCCTCCCTAGTGACCGAAACTGAGAACAATCCCTTCTACCAAGGA
 GATATAACATTCAAGCACACACACATCAAGGGCACCTGTGGATCATTATTTCCATGATCCAGAGTT
 CGCCGAGGGTTCAATCTTCTACCGCCGTGTTATGTATGCTCTAGAACAGACGGACTATTGCGATTTTG
 AAGTCCATTTTCGAGATGAGCCACAACACTATCCACAACCTGGATCGGTGGGGCTGCACCATATCCATG
 GCGAGCCTGGACTACCCGCGTATGACCCGTTGTTTTTCATCCATCACTCATTTACCGACCGGATCTG
 GGCAATATGGCAAGC

Notoplax conica

ATGCCATGGTCATTCGACCGAACATTTAAATACGATATCACGGCGGCGCTGAAGAACTCGGTGTATC
 ACTTCGAGACGAAAGATTCACATTCGAGGTTACCATCGTTGCTGTCAACGGTACGAGGTTACCAAACA
 GCGTCATTCAGCACCAACATTTACCTATGTCCCCGAGTAGGTGAGTTTGACCTAGGTTTTCAAAA
 AGCTGCTTCAAATGTGTTATAAAGAGAACATTGTTCCAGCTCAAACATACATATCACATAGTGGTCAG
 AGCTCATGTGTGCAAAGGAACTTCCCTATGAGAAGCTCATAACCACATGAGCTGGTTTTGCTGAATA
 CTGCACACGGTATACAGTTATACCCCTAAATAACCTAAATCCACGGTGAGTATCATTTCCAGACTTAAT
 GATTCAGCACTTGTGTTTTTTTTTTGCTCTATACAGCTGCCAGACACCATGTGCAAGCAGACCACGC
 GGGGGCACCTGGAATCAGGAAGAAGCTCGACAATTTATCTCCATCTGAAATAGACAACCTCAGAGATG
 CCTTGCGTCAGGTACAGGAGGATTCATCTGAGCGTGGCTACCAGGCCATAGCCGCTTACCACGGCCTT
 CCGCCTCAGTGCAAGACCCCCGACGGCAGTGACACCATGGCTTGTGTGTCCATGGCATGGCAAGCTT
 CCCACACTGGCACAGGCTCTACACAAAGCAAATGGAAGACGCTCTTGCCTTAAAGGAGCCAGACTAG
 GAATTCGATTTGGGACTGGACGCAACCTTTACCAGCCTCCCCTACCTCGTGACAGAGAGTGAGAAC
 AACCCATTTCTATCAAGCAGACGTCGCATTTGCACACGAGCACACATCCCAGATCCCGTGAAAACCT
 GTTCCGAGACCCGGAATATGGTGAAAATCATTTCTTCTATCGACAAGTCTCTTCCGCTTAGAGCAGA
 GAGATTTCTGTGACTTCGAGATCCAGTTGCAAGTGAGCCACAACGCCATCCACTCGTGGGTGGGCGGA
 TCTTCCCCTTACTCCATGTCTACTCTGCATTACACGTCATACGATCCGCTCTTCTACCTTCATCACTC
 CAACACTGACAGGCTGTGGGCAATATGGCAGGC

Nuttallina fluxa

ATGCCATGGTCATTTGACCGAACATTTAAATACGACATCACATCCCATTAGAAAAATTAGGAGCTAA
 TCTCGAAGAGGATAGATTCTACCTCGACGTAAGCATTGTGGCTGTCAACGGTTCAAAGCTGTCCAATG
 ACGTAATCCCAGCTCCTACTCTGACCTATGTACCAGCGGCAGGTAAGGGTATAAATATAATTA AAAC
 GGAACAAAAGAAGGAAACAAAATCTATAGTTTTGTAGGTCGATCATTTAGTCGTGGATAATTTAGATT
 TGGTGTGACCACTGAGTATTCAAGAGCTTGATAATCCTTTATTGGCAAAAAAATAATATTAATACT
 CCAACTCAGACGGACCGCACTGACATGTA CTCAACTCTAAATTAATCTGTGCAAAACCAGAGGGTTCAA
 TCAAACAAATTATGTGTATCTAAAAATTTCCATTTTTTTTCTTCTTTCAGCTGCTGTGCATCGAGAGG
 AAGCAGATTTGGTTGGTGCTCCTGGTATAAGAAAGAATGTAGATGATCTATCGCCTTCTGAGATTGAA
 AACCTTAGAGATGCATTGCGACAAGTTCAAGAAGATACGTCTGAAAGAGGATTCCAAGCGCTTGCCTC
 TTACCACGGTCTGCCAGCCCAATGCAGAACGCCAGATGGCAGTGACACAATGGCTTGTGTCATGCATG

GCATGGCCAATTTCCCACATTGGCATCGTTTATACACTAAACAGATGGAGGATGCCTTGGCTCTGAAA
 GGAGCCCGTATTGGAATACCATACTGGGACTGGACCCAATCGTTCACATCGTTGCCATACCTTGTAC
 TAGTCCCTGATAACAATCCATTCTATCGTGGAAAAGTGGCCTTTAAAAATGAATATACCTCAAGAGATC
 CCGTTCCTAACTTGTTCAGAGATCCAGAGTATGGAGAAAAATCCTTCTTTTACCGTCAAGTTTTATTT
 GCCTTGGAGCAAACAGATTTCTGTGATTTTCGAGATTCAATATGAGGTGTCCATAATGCCATTTCATTC
 GTGGGTAGGCGGGCAATCACCTTACTCAATGTCAACATTACATTATACCTCATAACGATCCATTATTTT
 ATTTACATCACTCAAACACTGACAGACTGTGGGCTATATGGCAAGC

Nuttallochiton mirandus

ATGCCATGGTCATTTGACAGAACATTCAAGTACGACATAACCCCAGCCCTGAAACGATTGGGAGTTGA
 TTTGGAAGAAGACACATACTACCTGGATATTAGCATCGTAGCTGTAAACGGAACAAAGCTATCAAACG
 ACGTCCCTCCAGCGCCGACTCTCACCTACGCCCGGCTACATGTAAGACACCAACTTATGTGTAATCT
 GTTATGAAAGATAGGATCATTATTTATCATTAAAGGTGTAGCAAAGTCCATAGTTTAAAAACTTCTCGTTT
 TATCGATTTTTTACTGTAGGCCCTACACCAAAATTTTAAATTGCACTTATCATCAGAACTTATAAACA
 ATGAAATCTAGCTTAATATTAAGTCGCTCAATGCATACATTACTTACATAGATTCTAGTATGGAGCGG
 TTTACTAAACTTGTCAACAATAAAGCGACAAAAAACACTTTATCTCTACTTTACCTGATGATGGAGAC
 AGTTTTCTTCGAAAGCTTGTAAATACTCCAAAGATGTACTTCAAAGTTTTTAGTCGCTATAACATTAC
 TTACATTTTTCGTTTTAGCTCCGGGACGTCGCTGGAGTCGGACCACGCAGGAGCCCTGGAATCAGA
 AAGAACGTTGACACCCTTTCCGACGCGAAATTAAGAACCTGAGAGACGCGCTTCGAGCAGTACAAGC
 CGACTCTTCAGATCACGGATTTTCAGGCTCTGGCAGCCTACCACGGGAAGCCTGCTCAATGCAGAACAC
 CTGATGACAGCGACACGATGGCTTGCTGCGTTCACGGTATGGCAAGCTTCCCACATTGGCACAGGTTG
 TACACAAAGCAAATGGAAGACGCCCTTGCTTTGAAGGGAGCCAGAATTGGAATTCATATTTGGGATTG
 GGCACATCCCTTTACTAGACTGCCGTATCTTGTAACCGAAACTGAGAACAATCCATTTTACAGTGGCG
 AAGTAGCCTTCAAGAACGAACGTACCACCAGAGACCCTGTACCCAATCTTTTCAGGGACCCAGAGTAT
 GGAGAGAAGTCTTTCTTTTATCGCCAAGTCTCTACGCCCTCGAACAAAGGGACTTTTTGTGACTTTGA
 AATCCAGTTTGAAGTTAGTCACAACGCTATTCAATTCGTGGGTAGGCGGGGACTCACCTACTCAATGT
 CAACACTTCACTACACAGCATATGATCCTCTCTTCTATCTTACCCTCCAACACGGACAGGCTATGG
 GCAATATGGCAGGC

Onithochiton hirasei

ATGCCATGGTCATTCGACAGAACATTTAAATACGACATCACGCCTGCACTGAAGAAATTAGGTGTCAG
 TTTGTCCGAAGATTTGTTCCACTTGAAGATAACCATTGTGGCCGTCAATGGATCAACTCTGGCGAACG
 ATGTTATCCCGGCGCCTACACTGACCTTCGTACCAGCTGCTCGTAAGTCAACTCCCCATACATTTTCG
 GTAACGTCTCAATCTCAGCGGTTTGCTGTACTCAGCTTTTCTGCAGCCATACTATAACAGACCCGAACC
 GTACAGTGACAAATCTTGGTATGGCGTAAAAACATGAAAAAGATCAACCTCAATAAATACTTTTGGGC
 ATATATCTTAAATCTTTTAGTCGGCCATTTTCGCATAAAAACAGTCATTATATGATTGGCGAAGTGTCC
 AAAACACTGGTAACAACCGTTCGAACACCAAAAACATAAAAAACGGTTGTTTTGTTTTATCGGTATTTA
 TTGCATATCACGAGAACCCTTATATTAGAGAACAGATGTGTAACCTTACTGACACACCCGTATCTTGTAT
 TTTTTATTTCGATATAGGTGCTGGAAGACAAGCGGAAGCCGATCACGTGGCAGCCCCAGGAATCAGGAA
 AAATGTCAACGAGTTGTCTACGTCGGAATTTGAGAATCTACGCGATGCCATGCGCCAAGTACAGGGAG
 ACTACTCTCAGAGGGGTTACCAGGCTCTGGCTTCCTATCATGGTTTTGCCTGCCAAATGTAAAACCTCT
 GATGGTAGCGACACAATGGCCTGCTGTCTCCATGGGATGGCCAATTTCCCTCACTGGCATCGACTGTA
 CACTAAACAAATGGAAGACGCTCTGGCTCTGAAAGGCGCCCGCCTGGGAATACCATATTGGGATTGGA
 CAATGCCCTTACGAGTTTACCGTACCTCGTACAGAAACCGAAAACAACCCTTTCAACAGAGTGAAG
 ATCGTCTTTAAGAACCAGTGGACTAGCAGAGATCCGGTTCCAAACCTCTTCAGAGACCCAGAGTACGG
 TGAAAAATCCTTCTTTTACCGCCAAGTGTATTCGCCTTAGAGCAAACCTGACTTCTGTGACTTTGAAA
 TCCAGTTTGAAGGTGAGCCACAATGCTATTCAATTCATGGGTAGGAGGGTCTTCTCCGTAATCCATGTCA
 ACTCTTCAATTACACATCCTACGATCCACTGTTCTTCTCCTCCGCACTCTAACACGGACAGGCTCTGGGC
 CATATGGCAGGC

Plaxiphora aurata

ATGCCATGGTCATTTGACAGAACATTTAAGTATGATATAACTGGAGCGCTGAAAAAGCTAGGCGTTGC
 TCTTCAAACCGGCTTTTCTTCTTAAATATCAACATAGTTGCTGTCAACGGAACCAAATTGCCAATA
 ACATCATACCAGCCCCAGCTTTACCTTCGTCCCGGCTAAATGTAAGCAGCTTTACTTATATCTCTCG
 CTCAAACCTAAGCCGTCCAAAATGATTGCATAATTTCTGCGATTTCAATTTCTATTATAAAAATGTTACC
 ATTTCTGTACTACAATACACTTTAAATAATGATAAAGTTTGAATTACTTGGTCTGAATTTTTCTGTACT
 TCTAACCTTCAAGTGGTGTAAATTTTAGTAGAATCTGACATATCCCAAAGACTCTTATTATTTTTTGT
 TATAATAATAGACGAATACTGCATCCGTGAACCCGGGACCAGGTCTAATGTAACACGATGTATCTTTT
 AGTCGCTAAAAGAAGTGATTTATGTTTTAGTTGCCGGGATCACCTTGAGACCGATCGTACTGGGGC
 ACCTGGGATTAGAAAAGTGTGGAAAATCTATCCCCGTCTGAAATTGACAATCTGAGAGATGCATTGC
 GTCAAGTCCAAGACGATGCGTCGGAGCGTGGATACCAGGCATTTGGCCGCCTACCACGGCCTTCTGTCT
 CAGTGTAGGACTCCTGACGACAGCGACTCGATGGCATGCTGCGTCCACGGTATGCCAGCTTCCCACA
 CTGGCACAGATTATACACCAAGCAGATGGAAGACGCCCTTGCATTGAAGGGAGCCAGATTGGGGATTC
 CCTACTGGGACTGGACACAGCCATTCCTAGCCTTCCGTTCTTTGTTACCGAAACCGAGAACAATCCC
 TTCTACCAAGGAAATGTTGCCTTTGTGAACCAACACACCACCAGAGACCCAGTGCCAAATCTGTTTAG
 GGATCCGGAATTTGGCGAGAAGTCGTTCTTTTATCGACAAGTCTTATTTGCCCTTGAGCAGACAGATT
 TTTGTGACTTTGAGATCCAATTCGAGGTGAGCCATAACGCCATCCATTTCTGGGTGGGCGGTGACTCT
 CCGTACTCTATGTCGACCCTGCACTACACGTCTTACGATCCTCTCTTCTTCTTCCATTCCAACAC
 TGACAGGCTGTGGGCCATGTGGCAGGC

Stenosemus albus

ATGCCATGGTCATTCGACCGAACATTTAAATACGATATCACAAGTGCATTGAAGAACTAGGAGTGGA
 TTTGGACGAAGACCTTTTCCACTTGAAGTTGAGCATCGTGGCTGTGAACGGAACAGCTCTCGCTAACG
 ATGTGATCCCAGCTCCAACATTTCTCCTTCGTACCAGCCTCTGGTAAGTCCTCATCGTAGACCTCTTTT
 CTTTCAGGCATCACAAGTGTTCGCAAAAATCTCATGAACAGTGTACAATGCATAACAATGTCAGGA
 TTATTACTGCTGAATGAATTCATAAGCAAATATGACAGGCTTTGAGATGCAACCGCTGTAATGTATGT
 ATTTGTCACATCAAAAAACAAAATTTAAATGCCAACCCCTAACATCTGATTAATCTCTCTGTTGTAGG
 TTCCGGAAGAAAGGTAGAAGGTGATCATGTGCTGCCCCGGGAATAAGAAAAGTGTGACGAAGTGT
 CTTTCATCAGAAATTGAAAATCTACGAACCGCCTTGGCAAGGGTGAAGGGGACTTTTCTCAGCGGC
 TATCAAGCTATCGCATCCTACCACGGCATGCCTGCAAAATGCAGAATCCTGATGGAAGTGCACAAT
 GCGGTGTTGTCTCCATGGTATGGCTACCTTCCCTCACTGGCATCGATTGTACACAAAGCAAATGGAAG
 ATGCTCTTGGCCCTCAAAGGAGCTCGTCTTGGACTGCCATACTGGGACTGGACACAGCCATTTACAAGT
 TTGCCCCACCTCGTTACTGATACTCATAACAATCCATTCACGAGGGAAACATTTGCTTCAAGAATAC
 ATTCATACCAGAGATCCAGTTTCCAATCTGTTCCGGGATCCTCAGTATGGCGAGAAATCATTCTTCT
 ACCGTCAGGTCTGTACGCATTGGAGCAGACGGATTTCTGTGACTTTGAAAATCCAGTTTGAAGTTAGC
 CACAATGCCATCCACTCCTGGGTAGGCGGTTTCATCGCCCTACTCCACGTCAACTCTGCACTACACATC
 TTACGATCCTCTATTCTACCTCCACCATTCCAACACGGACAGACTGTGGGCAATATGGCAAGC

Tonicia chilensis

ATGCCATGGTCATTCGACAGAACATTTAAATACGACATCACGGGTGCTCTTAAGAACTAGGTGTCAG
 TTTGTCAGAAGACTTATTCACCTGAAGATCACCATTGTGGCTGTCAACGGAACGACTCTGTCTAACG
 ATGTTGTCGCGATGCCACCCTGACATTCGTGCCAGCTTCCAGTAAGTTCTTTGTCTATCCATATTCC
 ATCACGTCTAAACCTCAACAATTATGTCTGTGACGTACGACTAGTGGTGTTTTTACCATTAGGCAGAA
 CCGATTTAAACAGTAATAACATTTAACCAGCCTATGGCAGTTAAGAGACTGCGCTAAAATATAAAAATG
 ATGAACTTTTGTGTTGCCGTATGTTTTTGTTCAGAGATAATAATACGGTTGTTTTAAATATTTAT
 TAAATGTCCTTGGAAATTTAGAGAACAGATGTATATATCTCTGGAGGCGAGGTATCCAGACGACTATTC
 AGCCGTCAACCGCTAAACAATTTCCACTTCAAAAAATTAACGTCACAATCTCATCATATATATTTT
 AATTTCAACTAAAATATAGTTACCTGACAGTAGAAAATAGCCAATATTTTTCAATGATGTCGGGAAGACA
 CATATATGACACGTGGTATCCTGAATTTCTCTTTACAGGCTCTGGCATAACAAGCAGAAGCTGACCACG
 TGGCTGCTCCCGGATCAGGAAGAATGTCGACGAGTTGTCATCATCAGAAATGGAATCTCCGAGAT
 GCCGTGCGCCAAGTGCAGGCAGATTTCTCTAGCCGTGGTTACCAGTCTCTCGCCTCCTATCACGGCCT
 GCCCCCGGTTGATGACGGCCGATGGCAGCGACACAATGGCCTGCTGCCTCCATGGAATGCCAATT
 TCCCTCACTGGCATCGACTGTACACCAAGCAAATGGAAGATGCTCTAGCCCTCAAAGGAGCTCGACTT

GGAATACCGTACTGGGATTGGACAATGCCATTTACAAGTTTACCGTACCTCGTTACCGAAACTGAAAA
 CAATCCATTCATAAAGGTGAAAATCGTGTTCAAGAATCAGTACACGACCAGAGACCCAGTACCTAACC
 TTTTCAGAGACCCCGAGTATGGAGAAAAATCCTTCTTCTACCGCCAAGTCTTATTCGCTTTGGAGCAA
 ACTGACTTCTGTGACTTTGAAATCCAGTTTGAAGTGAGCCACAATGCTATTCATTCGTGGGTAGGAGG
 TTCATCCCCCTACTCCATGTCCACTCTGCATTATACATCGTACGACCCACTATTCTTCCCTCCACCACT
 CCAACACAGACAGGCTCTGGGCAATATGGCAAGC

4.5.2. Sequenzen der FU-d

Die aufgelisteten Nukleotidsequenzen umfassen den Sequenzabschnitt der Kupferbindungsstelle A („PYWDW“ bis „WAIWQ“) aus der FU-d.

Callochiton bouveti

GGTTTCCCCTACTGGGATTGGACCAGGAAGATTACAGAGTTACCGGCATTAGTGAGTGAAGCAACATT
 TTATAACTCTCGATCTCTTCGACTGGATCCCAATCCATTTTTCCGCGGCGACATCAGCTTTGAGAATT
 CATTTACCACACGAGACCTACAACCAGAGCTCTTTAACAATGATTACTTCTACGACAATATTCTATTA
 GCCTTTGAAATGGAGGATTTCTGTGATTTTGAGGTACAGTTTGAATAAACCACAACGCTATTCATGC
 ATGGGTAGGAGGTAGAGACCCACACTCTATGGCTACTCTGGAATACACGGCATAACGATCCTCTCTTCT
 TCCTTCATCATAACCAATGTTGACAGGCTTTGGGCAATATGGCAAGC

Chorioplax grayi

GGCTTGCCCTACTGGGACTGGACGAAAAAATTCGATAGATTGCCGGCGCTAGTAAGCGAACCCCTCCTA
 CTACAATTCTCGAATGCTTCGACTTGACCAGAACCCCTTCTTCCGTGGCGAGATTACATTCGAAAACA
 CGCACACCACGCGGGATCCACAGCCAGAATTGTTCAACACGGACTATTTCTATAGAAATGTCCTTCTC
 GCATTCGAACAAGAAGACTTCTGCGACTTCGAAGTTCAGTTTGAGCTTGTCACAATGCCATCCATTC
 CTGGATCGGAGGGCGTGATCTCTATTCTATGTCGGAAGTGCATTACACTGCTTATGACCCAATCTTCT
 TCCCTCACCATGCCAACGTTGACAGGCTATGGGCAATATGGCAAGC

Lepidochitona cinerea

GGTTTGCCTTACTGGGATTGGACAACAAGAATTGACCGATTACCATCACTGGTGAGCGAAGCGACATT
 TTACAACCTCCCGTACCCTTCGATTAGATCGAAATCCTTTCTTTCAGAGGAGAAATTTCAATTTGAAAATG
 CTTTTACAACAAGGGACCCACAACCAGAACCTTTTAAACAGCGACTACCTGTACGAACAAATACTACTG
 GCCTTTGAAGAAGAGGACTTTTGTGATTTTGAAGTACAATTCGAAATTGCCATAATGCCATTCATGC
 CCTGGTGGGTGGAAGAGACTCCTATTCTCTTTCGACGCTCGATTATACTGCTTATGATCCTATCTTTT
 TCTTGCATCATACTAACGTAGACAGGCTGTGGGCAATATGGCAAGC

Nierstraszella lineata

GGTCTTCCGTACTGGGACTGGACGAAAAAATTCGATAGATTGCCGGCGCTAGTAAGCGAACCCCTCCTA
 CTACAATTCTCGAATGCTTCGACTTGACCAGAACCCCTTCTTCCGTGGCGAGATTACATTCGAAAACA
 CGCACACCACGCGGGATCCACAGCCAGAATTGTTCAACACGGACTATTTCTATAGAAATGTTCCCTCTC
 GCATTCGAACAAGAAGACTTCTGCGACTTCGAAGTTCAGTTTGAGCTTGTCACAATGCCATCCATTC
 CTGGATCGGAGGGCGTGATCTCTATTCTATGTCGGAAGTGCATTACACTGCTTATGACCCAATCTTCT
 TCCTCACCATGCCAACGTTGACAGGCTATGGGCGATGTGGCAAGC

Tonicella marmorea

GGccTgCCCTACTGGGAtTGGACCAAGAGAATCGACAGGCTACCATCTTTAGTTAACGAAGCTACATT
 TTATAATTCACGTACTTTGCGCCTTGATGACAAATCCATTTTCAGAGGAAAAATAAGTTTTGAAGATG
 CTTACACTACTAGAGATCCACAACCAGAGTTGTAtAACAAATGATTATTTGTACAATCAAAATCCTGTTG
 GCCTTCGAAGAAGAAGACTTCTGTGATTTTGAGGTACAGTTTGAAATCGCTCACAATGCTATCCACGC
 TTTGGTTGGAGGCAGAGATCCGTATTCACTTTCAACGCTGGATTATACTGCCTATGACCCCATCTTCT
 TCTTACATCACACTAATGTCGACAGATTGTGGGCAATATGGCAGGC

5. Internet-Adressen

Methode bzw. Programm	Internet-Adresse
Align	http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi
Blast NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Chromas	http://www.technelysium.com.au/chromas.html
ClustalX 1.83	ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/
Expasy-tools	http://www.expasy.ch/tools/
GeneDoc	http://www.psc.edu/biomed/genedoc/
Lalign	http://www2.igh.cnrs.fr/bin/lalign-guess.cgi
Mega 3.1	http://www.megasoftware.net/
Oligo calc	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html
Oligo 2002	http://www.bioinformatics.vg/bioinformatics_tools/oligo2002.shtml
Translate	http://www.expasy.ch/tools/dna.html
Treeview	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
Zoologie, Abt. 2, Uni Mainz	http://www.uni-mainz.de/FB/Biologie/Zoologie/abt2

G LITERATUR

- Albrecht U., Keller H., Gebauer W., Markl J., 2001.** Rhogocytes (pore cells) as the site of hemocyanin biosynthesis in the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Cell Tissue Res.* 304: 455-462.
- Altenhein B., Markl J., Lieb B., 2002.** Gene structure and hemocyanin isoform HtH2 from the mollusc *Haliotis tuberculata* indicate early and late intron hot spots. *Gene* 301: 53-60.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Alves-Brito C.P., Simpson A.J., Bahia-Oliveira L.M., Rabello A.L., Rocha R.S., Lambertucci J.R., Gazzinelli G., Katz N., Correa-Oliveira R., 1992.** Analysis of anti-keyhole limpet hemocyanin antibody in Brazilians supports its use for the diagnosis of acute *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86: 53-56.
- Áspan A., Söderhall K., 1991.** Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by endogenous serine proteinase. *Insect. Biochem.* 21: 363-373
- Bairoch A., Apweiler R., 1999.** The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL. *Nucleic Acids Research* 27: 49-54.
- Bandel K., 1998.** Scissurellidae als Modell für die Variationsbreite einer natürlichen Einheit der Schlitzbandschnecken (Mollusca, Archaeogastropoden). *Mitteilungen des Geologisch-Paläontologischen Instituts der Universität Hamburg* 81: 1-120.
- Barucca M., Biscotti M.A., Olmo E., Canapa A., 2006.** All the three ParaHox genes are present in *Nuttallochiton mirandus* (Mollusca: Polyplacophoren): Evolutionary Considerations. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 306B: 164-167.
- Behrens J.W., Elias J.P., Taylor H.H., Weber R.E., 2002.** The archaeogastropod mollusc *Haliotis iris*: tissue and blood metabolites and allosteric regulation of haemocyanin function. *The Journal of Experimental Biology* 205: 253-263.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S., 2004.** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783-795.
- Benton, 1993.** *The Fossil Record* 2: 125-270. Chapman & Hall, London.
- Berg, S., 2001.** Zur Primärstruktur des Hämocyanins aus Käferschnecken. Staatsexamensarbeit, Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.
- Bergmann S., Lieb B., Ruth P., Markl J., 2006.** The hemocyanin from a living fossil, the cephalopod *Nautilus pompilius*: Protein structure, gene organization and evolution. *J Mol Evol* 62: 362-374.
- Bergmann S., Markl J., Lieb B., 2007.** The first complete cDNA sequence of the hemocyanin from a bivalve, the protobranch *Nucula nucleus*. *J. Mol. Evol.* 64: 500-510.
- Beuerlein K., Westermann B., Ruth P., Schimmelpfennig R., Schipp R., 2000.** Hemocyanin re-uptake in the renal and branchial heart appendages of the coleoid cephalopod *Sepia officinalis*. *Cell Tissue Research* 301: 413-421.

- Beuerlein K., Ruth P., Scholz F.R., Springer J., Lieb B., Gebauer W., Westermann B., Schmidtberg H., von Boletzky S., Markl J., Schipp R., 2004.** Blood cells and the biosynthesis of hemocyanin in *Sepia* embryos. *Micron* 35: 115-116.
- Bonaventura C., Bonaventura J., Miller K.I., van Holde K.E., 1981.** Hemocyanin of the chambered *Nautilus*: structure-function relationships. *Arch. Biochem. Biophys.* 211: 589-598.
- Bonnaud L., Ozouf-Costaz C., Boucher-Rodini R., 2004.** A molecular and karyological approach to the taxonomy of *Nautilus*. *C.R. Biologies* 327: 133-138.
- Boteva R., Severov S., Genov N., Beltramini M., Pallhuber M.M., Tognon G., Salvato B., 1991.** Biochemical and functional characterization of *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B: 493-501.
- Brown A.C., Terwilliger N.B., 1998.** Ontogeny of hemocyanin function in the Dungeness crab *Cancer magister*: hemolymph modulation of hemocyanin oxygen-binding. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 201, Issue 6: 819-826.
- Brown L., 1991.** Genetic variation and population structure in the blacklip abalone, *Haliotis rubra*. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 42: 77-91.
- Brown L., 1993.** Biochemical genetics and species relationships within the *Haliotis* (Gastropoda: Haliotidae). *Journal of Molluscan Studies* 59: 429-443.
- Brown L., 1995.** Genetic evidence for hybridisation between *Haliotis rubra* and *Haliotis laevigata*. *Marine Biology* 123: 89-93.
- Boudet N., Aubourg S., Toffano-Nioche C., Kreis M., Lecharny A., 2001.** Evolution of Intron/Exon Structure of DEAD Helicase Family Genes in *Arabidopsis*, *Caenorhabditis*, and *Drosophila*. *Genome Research* 11: 2101-2114.
- Bourdon V., Harvey A., Lonsdale D.M., 2001.** Introns and their positions affect the translational activity of mRNA in plant cells. *EMBO Rep.* 2: 394-398.
- Boyer B.C., 1989.** The Role of the First Quartet Micromeres in the Development of the Polyclad *Hoplodana inquilina*. *Biol. Bull.* 177: 338-343.
- Brooker L.R., Lee A.P., Macey D.J., Webb J., van Bronswijk W., 2006.** In situ Studies of Biomineral Deposition in the Radula Teeth of Chitons of the Suborder Chitonina. *Venus* 65 (1-2): 71-80.
- Bucher P., 1990.** Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* 212: 563-578.
- Buckland-Nicks J., 1995.** Ultrastructure of sperm and sperm-egg interaction in Aculifera: implications for molluscan phylogeny. *Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle* 166: 129-153.
- Buckland-Nicks J., 2006.** Fertilization in Chitons: Morphological Clues to Phylogeny. *Venus* Vol. 65, No. 1-2: 51-70.
- Burmester T., 2001.** Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Mol Biol Evol.* 18: 184-195.

- Carlini D.B., Young R.E., Vecchione M., 2001.** A Molecular Phylogeny of the Octopoda (Mollusca: Cephalopoden) evaluated in light of morphological evidence. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21: 388-397.
- Carmel L., Rogozin I.B., Wolf Y.I., Koonin E.V., 2007.** Evolutionarily conserved genes preferentially accumulate introns. *Genome Research* 17: 1045-1050.
- Chabicoovsky M., Niederstatter H., Thaler R., Hodl E., Parson W., Rossmannith W., Dallinger R., 2003.** Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicol Appl Pharmacol.* 190(1): 25-36.
- Chignell D., van Holde K.E., Miller K.I., 1997.** The hemocyanin of the squid *Sepioteuthis lessoniana*: Structural Comparison with other cephalopod hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol.* 118: 895-902.
- Chomczynski P., Sacchi N., 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Cohen S.N., Chang A.C., Hsu L., 1972.** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69(8): 2110-2114.
- Colgan D.J., Ponder W.F., Eggler P.E., 2000.** Gastropod evolutionary rates and phylogenetic relationships assessed using partial 28S rDNA and histone H3 sequences. *Zoologica Scripta* 29: 29-63.
- Colgan D.J., Ponder W.F., Beacham E., Macaranas J.M., 2003.** Gastropod phylogeny based on six segments from four genes representing coding or non-coding and mitochondrial or nuclear DNA. *Molluscan Research* 23: 123-148.
- Crofts D.R., 1929.** *Haliotis*. Liverpool Marine Biology Committee Memoirs 29: 1-174.
- Crofts D.R., 1937.** The development of *Haliotis tuberculata* with special reference to organogenesis during torsion. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, *Biological Sciences* 208: 219-268.
- Cuff M.E., Miller K.I., van Holde K.E., Hendrickson W.A., 1998.** Crystal structure of a functional unit from *Octopus hemocyanin*. *J. Mol. Biol.* 278: 855-870.
- Cuff M.E., Hendrickson W.A., Lamy J., Lamy J.N., Miller K.I., van Holde K.E., 1990.** Crystals of the carboxyl-terminal functional unit from *Octopus dofleini* hemocyanin. *J. Mol. Biol.* 213: 11-15.
- Dauphin Y., Cuif J.P., Mutvei H., Denis, A., 1989.** Mineralogy, chemistry and ultrastructure of the external shell-layer in ten species of *Haliotis* with reference to *Haliotis tuberculata* (Mollusca: Archaeogastropoda). Bulletin of the Geological Institute of the University of Uppsala, New Series 15: 7-38.
- Dayhoff M.O., Schwartz R.M., Orcutt B.C., 1978.** A model of evolutionary change in proteins. In: Dayhoff M.O. (Ed.). Atlas of protein sequence structure 5 (Suppl. 3). *National Biomedical Research Foundation*, Washington DC, USA.
- De Souza S.J., Long M., Schoenbach L., Roy S.W., Gilbert W., 1996.** Intron positions correlate with module boundaries in ancient proteins. *Evolution*, Vol. 93: 14632-14636.

- De Souza S.J., Long M., Klein R.J., Roy S.W., Lin S., Gilbert W., 1998.** Toward a resolution of the introns early-late debate: Only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins. *Evolution*, Vol. 95: 5094–5099.
- Decker H., Rimke T., 1998.** Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J.Biol.Chem.* 273: 25889-25892.
- Decker H., Terwilliger N., 2000.** Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J. Exp. Biol.* 12: 1777-1782.
- Decker H., Tuzek F., 2000.** Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *TIBS* 25: 392-397
- Decker H., 2001.** SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum* and *Cancer magister*. *J Biol Chem.* 276(21): 17796-17799.
- Degnan B.M., Groppe J.C., Morse D.E., 1995.** Chymotrypsin mRNA expression in digestive gland amoebocytes: cell specification occurs prior to metamorphosis and gut morphogenesis in the gastropod, *Haliotis rufescens*. *Development Genes and Evolution* 205: 97-101.
- Degnan B.M., Morse D.E., 1995.** Developmental and morphogenetic gene regulation in *Haliotis rufescens* larvae at metamorphosis. *American Zoologist* 35(4): 391-398.
- Degnan B.M., Degnan S.M., Morse D.E., 1997.** Regulation of tropomyosin gene expression and myofibrillogenesis differs among muscle systems examined at metamorphosis of the gastropod *Haliotis rufescens*. *Development Genes and Evolution* 206: 464-471.
- Drexel R., Siegmund S., Schneider H.J., Linzen B., Gielens C., Preaux G., Lontie R., Kellermann J., Lottspeich F., 1987.** Complete amino-acid sequence of a functional unit from a molluscan hemocyanin (*Helix pomatia*). *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 368: 617-635.
- Eernisse D.J., 1984.** *Lepidochitona Gray*, 1821 (Mollusca: Polyplacophoren), from the Pacific Coast of the United States: Systematics and reproduction. University of California, Santa Cruz. Ph.D. Dissertation.
- Erixon P., Sennblad B., Britton T., Oxelman B., 2003.** Reliability of Bayesian Posterior Probabilities and Bootstrap Frequencies in Phylogenetics. *Syst. Biol.* 52: 665-673.
- Evans B., White R.W.G., Elliott N.G., 2000.** Characterization of microsatellite loci in the Australian blacklip abalone (*Haliotis rubra*, Leach). *Molecular Ecology* 9: 1183–1184.
- Fedorova L., Fedorov A., 2003.** Introns in gene evolution. *Genetica* 118: 123-131.
- 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.
- Finkbeiner S., 2001.** New Roles for Introns: Sites of Combinatorial Regulation of Ca²⁺- and Cyclic AMP-Dependent Gene Transcription. *Signal Transduction Knowledge Environment*, Issue 94.
- Fitsch A., 2001.** Zur Struktur des Hämocyanins der Polyplacophoren. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

- Footo M., Sepkoski J.J.Jr., 1999.** Absolute measures of the completeness of the fossil record. *Nature* 398: 415-417.
- Fleming A.E., Hone P.W., 1996.** Abalone culture. Selected papers from the second International Symposium on abalone held in Hobart, Tasmania, Australia, 7–11 February 1994. *Aquaculture* 140: i–viii: 1–195.
- Fritz M., Belcher A.M., Rademacher M., Walters D.A., Hansma P.K. Sturcky G.D., Morse D.E., Mann S., 1994.** Flat pearls from biofabrication of organized composite on inorganic substrates. *Nature* 371: 49–51.
- Gatsogiannis C., Moeller A., Depoix F., Meissner U., Mark J., 2007.** *Nautilus pompilius* Hemocyanin: 9 Å Cryo-EM Structure and Molecular Model Reveal the Subunit Pathway and the Interfaces between the 70 Functional Units. *Journal of Molecular Biology* 374, Issue 2: 465-486.
- Gebauer W., Harris J.R., Heid H., Süling M., Hillenbrand R., Söhngen S., Wegener-Strake A., Markl J., 1994.** Quaternary structure, subunits and domain patterns of two discrete forms of keyhole limpet hemocyanin: KLH1 and KLH2. *Zoology* 98: 51-68.
- Gebauer W., Stoeva S., Voelter W., Danese E., Salvato B., Beltramini M., Markl J., 1999.** Hemocyanin subunit organization of the gastropod *Rapana thomasiana*. *Arch. Biochem. Biophys.* 372: 128-134.
- Geiger D.L., Groves L.T., 1999.** Review of Fossil Abalone (Gastropoden: Vetigastropoden: Haliotidae) with Comparison to Recent Species. *Journal of Paleontology*, Vol. 73, No. 5: 872-885
- Geiger D.L., 1999.** A total evidence cladistic analysis of the Haliotidae (Gastropoden: Vetigastropoden). PhD Thesis, University of Southern California, Los Angeles.
- Geiger D.L., 2000.** Distribution and biogeography of the Haliotidae (Gastropoden: Vetigastropoden) world-wide. *Bollettino Malacologico* 35: 57–120.
- Geiger D.L., Poppe, G.T., 2000.** Haliotidae. In: *Conchological Iconography* (G. T. Poppe & K. Groh, eds), 1–135. Conchbooks, Hackenheim.
- Geiger D.L., Jansen P., 2004.** Revision of the Australian species of Anatomidae (Gastropoden: Vetigastropoden). *Zootaxa* 415: 1–35.
- Geiger D.L., Thacker C.E., 2005.** Molecular phylogeny of Vetigastropoden reveals non-monophyletic Scissurellidae, Trochoidea and Fissurelloidea. *Molluscan Research* 25: 47–55.
- Georgieva D.N., Genov N., Perbandt M., Voelter W., Betzel C., 2004.** Contribution of disulfide bonds and calcium to molluscan hemocyanin stability. *Z. Naturforsch.* 59C: 281-287.
- Gerdemann C., Eicken C., Krebs B., 2002.** The crystal structure of catechol oxidase: New insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.* 35: 183-191.
- Gielens C., Bosman F., Preaux G., Lontie R., 1983.** Structural studies by limited proteolysis of the haemocyanin of *Sepia officinalis*. *Life Chem. Rep.* 1: 121-124.
- Gielens C., De Sadeleer J., Preaux G., Lontie R., 1987.** Identification, separation and characterization of the hemocyanin components of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B(1): 181-186.

- Gielens C., Leyssen P., Mouton T.M., Castermans D., De Geest N., Préaux G.A., 2000.** Isolation and identification of two types of subunits and of three types of dimers from the hemocyanin of *Sepia officinalis*. XIIth Conference on Dioxxygen Binding Proteins. Roscoff, France.
- Gielens C., De Geest N., Compennolle F., Préaux G., 2004.** Glycosylation sites of the hemocyanins of *Helix pomatia* and *Sepia officinalis*. *Micron* 35: 99-100.
- Giribet G., Okusu A., Lindgren A.R., Huff S.W., Schrödl M., Nishiguchi M.K., 2006.** Evidence for a clade composed of molluscs with serially repeated structures: monoplacophorans are related to chitons. *PNAS*, Vol. 103, No. 20: 7723-7728.
- Goodrich, J.A., Cutler, G., Tijan, R., 1996.** Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell*, 84: 825-830.
- Gowlett-Holmes K.L., 1987.** The suborder Chorioplacina Starobogatov & Sirenko, 1975 with a redescription of *Chorioplax grayi* (H. Adams & Angas, 1864) (Mollusca: Polyplacophora). *Trans. Proc. R. Soc. South Australia* 111: 105-110.
- Götting K.J., 1980.** Origin and relationships of the Mollusca. *Z. Zool. Syst. Evol. Forsch.* 18: 24-27.
- Grzych J.M., Dissous C., Capron M., Torres S., Lambert P.H., Capron A., 1987.** *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *J. Exp. Med.* 165: 865-878.
- Gu X., 1998.** Early metazoan divergence was about 830 million years ago. *J. Mol. Evol.* 47: 369-371.
- Gustafsen R.G., Reid R.G.B., 1988.** Larval and post-larval morphogenesis in the gutless protobranch bivalve *Solemya reidi* (Cryptodonta, Solemyidae). *Mar. Biol.* 97: 373-387.
- Hamilton M.G., Herskovits T.T., Furcinitti P.S., Wall J.S., 1989.** Scanning transmission electron microscopic study of molluscan hemocyanins in various aggregation states: comparison with light scattering molecular weights. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 102: 221-228.
- Harasewych M.G., Adamkewicz S.L., Blake J.A., Saudek D., Spriggs T., Bult C.J., 1997.** Phylogeny and relationships of pleurotomariid gastropods (Mollusca: Gastropoda): An assessment based on partial 18S rDNA and cytochrome c oxidase I sequences. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6: 1-20.
- Harris J.R., Horne R.W., 1991.** Negative staining. In: Harris, J.R. (Ed.). *Electron Microscopy in Biology*. IRL Press, Oxford, UK: 203-228.
- Harris J.R., Markl J., 1992.** Electron microscopy of a double helical tubular filament in keyhole limpet (*Megathura crenulata*) hemolymph. *Cell Tissue Res.* 269: 411-420.
- Harris J.R., Gebauer W., Söhngen S.M., Nermut M.V., Markl J., 1995.** Keyhole limpet hemocyanin (KLH): purification of intact KLH1 through selective dissociation of KLH2. *Micron* 26: 201-212.
- Harris J.R., Gebauer W., Söhngen S.M., Nermut M.V., Markl J., 1997.** Keyhole limpet hemocyanin (KLH), II: Characteristic reassociation properties of purified KLH1 and KLH2. *Micron* 28: 43-56.
- Harris J.R., Markl J., 1999.** Keyhole limpet hemocyanin (KLH): A biomedical review. *Micron* 30: 597-623.

- Harris J.R., Markl J., 2000.** Keyhole limpet hemocyanin: Molecular structure of a potent marine immunoactivator. A review. *Eur. Urol.* 37: 24-33.
- Harris J.R., Meissner U., Gebauer W., Markl J., 2004.** 3D reconstruction of the hemocyanin subunit dimer from the chiton *Acanthochiton fascicularis*. *Micron* 35: 23-26.
- Haszprunar G., Salvini-Plawen, L.V., Rieger R.M., 1995.** Larval planktotrophy - A primitive trait in the Bilateria? *Acta zoologica* (Stockholm), Vol. 76, No. 2: 141-154.
- Haszprunar G., 1996.** The molluscan rhogocyte (pore cell, Blaszelle, cellule nucale), and its significance for ideas on nephridial evolution. *J. Mol. Stud.* 62: 185-211.
- Hedegaard C. 1997.** Shell structures of the recent Vetigastropoden. *Journal of Molluscan Studies* 63: 369-377.
- Hellberg M.E., Vacquier V.D. 1999.** Rapid evolution of fertilization selectivity and lysin cDNA sequences in teguline gastropods. *Molecular Biology and Evolution* 16: 839-848.
- Hennig W., 1979.** Taschenbuch der Speziellen Zoologie. Teil 1, Wirbellose I. Verlag Harri Deutsch, Zürich, pp. 392.
- Herskovits T.T., Hamilton M.G., 1991.** Higher order assemblies of molluscan hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol.* B 99: 19-34.
- Herskovits T.T., Edwards M.D., Hamilton M.G., 1995.** The hemocyanin of the Californian black sea hare, *Aplysia vaccaria* Winkler. *Comp. Biochem. Physiol.* B 110: 515-521.
- Hochheimer A., Tjian R., 2003.** Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes & Development* 17: 1309-1320.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F., 2001.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Idakieva K., Severov S., Svendsen I., Genov N., Stoeva S., Beltramini M., Tognon G., Di Muro P., Salvato B., 1993.** Structural properties of *Rapana thomasiana* grosse hemocyanin: isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of two different dissociation products. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 53-59.
- Ivanov D.L., 1996.** Origin of Aculifera and problems of monophyly of higher taxa in molluscs. Pp. 59-65 in J.D. Taylor, ed. Origin and evolutionary radiation of the Mollusca. Oxford Science Publications, London.
- Jackson D., Leys S.P., Hinman V.N., Woods R., Lavin M.F., Degnan B.M., 2002.** Ecological regulation of development: induction of marine invertebrate metamorphosis. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 679-686.
- Jaekle, W.B., Manahan, D.T. 1992.** Experimental manipulation of the organic composition of seawater: implications for studies of energy budgets in marine invertebrate larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 156: 273-284.
- Javahery R., Khachi A., Lo K., Zenie-Gregory B., Smale S.T., 1994.** DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 14: 116-127.
- Jellie A.M., Tate W.P., Trotman C.N., 1996.** Evolutionary history of introns in a multidomain globin gene. *J. Mol. Evol.* 42: 641-647.

- Johnson P.F., McKnight S.L., 1989.** Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 799-839.
- Kaas P., Van Belle R.A., 1985.** Monograph of living chitons (Mollusca: Polyplacophoren). Vol. 1. Order Neoloricata: Lepidopleurina. 240 pp., E.J. Brill/W. Backhuys.
- Kaas P., Van Belle, R.A., 1987.** Monograph of living chitons (Mollusca: Polyplacophoren). Vol. 3. Suborder Ischnochitonina Ischnochitonidae: Chaetopleurinae & Ischnochitoninae (pars). 302 pp., E.J. Brill/W. Backhuys, Leiden.
- Kaas P., Van Belle R.A., 1990.** Monograph of living chitons (Mollusca: Polyplacophoren). Vol. 4. Suborder Ischnochitonina Ischnochitonidae: Ischnochitoninae (continued). 298 pp., E.J. Brill, Leiden.
- Kaas P., Van Belle R.A., 1994.** Monograph of living chitons (Mollusca: Polyplacophoren). Vol. 5. Suborder Ischnochitonina Ischnochitonidae: Ischnochitoninae (continued). 402 pp. E.J. Brill/W. Backhuys, Leiden.
- Kaas P., Jones A.M., Gowlett-Holmes K.L., 1998.** Class Polyplacophoren. Pp. 161–194, pls 7–9 in: Beesley, P.L., Ross, G.J.B., Wells, A. (eds) Mollusca: The Southern Synthesis. *Fauna of Australia*. Vol. 5. Part A, CSIRO Publishing, Melbourne.
- Kaufmann J., Smale S.T., 1994.** Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes Dev.* 8: 821-829.
- Keller H., Lieb B., Altenhein B., Gebauer D., Richter S., Stricker S., Markl J., 1999.** Abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocyanin type 1 (HtH1). Organization of the approximately 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units f, g and h. *European Journal of Biochemistry* 264: 27–38.
- Kelly R.P., Sarkar I.N., Eernisse D.J., Desalle R., 2007.** DNA barcoding using chitons (genus *Mopalia*). *Molecular Ecology*, Notes 7.
- Kelly R.P., Eernisse D.J., 2007.** Southern hospitality: A latitudinal gradient in gene flow in the marine environment. *Evolution Int J Org Evolution* 61(3): 700-7.
- Kenchington E.L., Roddick D.L., Singh R.K., Bird C.J., 1994.** Analysis of the small-subunit rRNA genes sequences from six families of molluscs. *J. Mar. Biotechnol.* 1: 215-217.
- Kim C.B., Moon S.Y., Gelder S.R., Kim W., 1996.** Phylogenetic relationships of annelids, molluscs, and arthropods evidenced from molecules and morphology. *J. Mol. Evol.* 43: 207-215.
- Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J.C., Krebs B., 1998.** Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a discopper center. *Nat. Struct. Biol.* 5: 1084-1090.
- Klein R.D., Gu Q., Goddard A., Rosenthal A., 1996 .** Selection for genes encoding secreted proteins and receptors. *Genetics*, Vol. 93: 7108-7113.
- Kloc M., Zearfoss N., Etkin L., 2002.** Mechanisms of Subcellular mRNA Localization. *Cell*, Vol. 108, Issue 4: 533-544.
- Koch K.A., Thiele D.J., 1996.** Autoactivation by a *Candida glabrata* Copper Metalloregulatory Transcription Factor Requires Critical Minor Groove Interactions. *Molecular and cellular Biology*, Vol. 16, No. 2: 724–734.
- Kroll J., 1973.** Crossed-line immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.* 2: 79-81.

- Kurokawa T., Wuhrer M., Lochnit G., Geyer H., Markl J., Geyer R., 2002.** Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal(beta1-6)Man-motifs. *Eur J Biochem.* 269: 5459-5473.
- Laemmli U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lambertucci J.R., 1993.** Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 35: 399-404.
- Lamy J., Gielens C., Lambert O., Taveau J.C., Motta G., Loncke P., De Geest N., Preaux G., Lamy J., 1993.** Further approaches to the quaternary structure of octopus hemocyanin: A model based on immunoelectron microscopy and image processing. *Arch. Biochem. Biophys.* 305: 17-29.
- Lang W.H., 1988.** cDNA cloning of the *Octopus dofleini* hemocyanin: sequence of the carboxyl-terminal domain. *Biochemistry* 27: 7276-7282.
- Lang W.H., van Holde K.E., 1991.** Cloning and sequencing of *Octopus dofleini* hemocyanin cDNA: derived sequences of functional units Ode and Odf. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 244-248.
- Laurell C.B., 1965.** Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anal. Biochem.* 10: 358-361.
- Lauterbach, K.-E., 1984.** Das Phylogenetische System der Mollusca. *Mitteilungen der Deutschen Malakologischen Gesellschaft* 37: 66-81.
- Le Hir H., Nott A., Moore M.J., 2003.** How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 28: 215-220.
- Lee M.S.Y., 1999.** Molecular clock calibrations and Metazoen Divergence Dates. *J. Mol. Evol.* 49: 385-391.
- Lee Y.-H., Vacquier V.D., 1992.** The divergence of species specific abalone sperm lysin is promoted by positive Darwinian selection. *Biological Bulletin* 182: 97-104.
- Lee Y.-H., Vacquier V.D., 1995.** Evolution and systematics in Haliotidae (Mollusca: Gastropoden): inferences from DNA sequences of sperm lysine. *Marine Biology*, Vol. 124, No 2: 267-278.
- Lee Y.-H., Ota T., Vacquier V.D., 1995.** Positive selection is a general phenomenon in the evolution of abalone sperm. *Molecular Biology and Evolution* 12: 231-238.
- Leighton D.L., 2000.** The biology and culture of the California abalones. Dorrance Publishing Company, Pittsburgh, PA.
- Lewis C.A., Leighton, D.L., Vacquier V.D., 1980.** Morphology of abalone spermatozoa before and after the acrosome reaction. *Journal of Ultrastructure Research* 72: 39-46.
- Lieb B., Altenhein B., Lehnert R., Gebauer W., Markl J., 1999.** Subunit organization of the abalone *Haliotis tuberculata* hemocyanin type 2 (HtH2), and the cDNA sequence encoding its functional units d, e, f, g and h. *Eur. J. Biochem.* 265: 134-144.
- Lieb B., Altenhein B., Markl J., 2000.** The Sequence of a Gastropod Hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*). *J. Biol. Chem.* 275: 5675-5681.

- Lieb B., Altenhein B., Markl J., Vincent A., van Olden E., van Holde K.E., Miller K.I., 2001.** Structures of two molluscan hemocyanin genes: significance for gene evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4546-4551.
- Lieb B., Boisg uerin V., Gebauer W., Markl J., 2004.** cDNA sequence, protein structure, and evolution of the single hemocyanin from *Aplysia californica*, an ophistobranch gastropod. *J. Mol. Evol.* 59: 1-10.
- Lieb B., Markl J., 2004.** Evolution of molluscan haemocyanins deduced from DNA sequencing. *Micron* 35: 117–119.
- Lieb B., Dimitrova K., Kang H.S., Braun S., Gebauer W., Martin A.G., Hanelt B., Saenz S.A., Adema C.M., Markl J., 2006.** Red blood with blue-blood ancestry: intriguing structure of a snail hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (32):12011-6.
- Linn J.F., Black P., Derksen K., Rubben H., Thuroff J.W., 2000.** Keyhole limpet haemocyanin in experimental bladder cancer: literature review and own results. *Eur. Urol.* 37: 34-40.
- Long M., de Souza, S.J., Gilbert W., 1995.** Evolution of the intron-exon structure of eukaryotic genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 774-778.
- Long M., Rosenberg C., Gilbert W., 1995.** Intron phase correlations and the evolution of the intron/exon structure of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 12495-12499.
- Lund M., Kjems J., 2002.** Defining a 5' splice site by functional selection in the presence and absence of U1 snRNA 5' end. *RNA* 8: 166-179.
- Lynch M., Scofield D.G., Hong X., 2005.** The Evolution of Transcription-Initiation Sites. *Mol. Biol. Evol.*, 22(4): 1137 – 1146.
- Martin A.G., Depoix F., Stohr M., Meissner U., Hagner-Holler S., Hammouti K., Burmester T., Heyd J., Wriggers W., Markl J., 2007.** *Limulus polyphemus* hemocyanin: 10   cryo-EM structure, sequence analysis, molecular modelling and rigid-body fitting reveal the interfaces between the eight hexamers. *J Mol Biol.* 366 (4):1332-50.
- McArthur A.G., Harasewych M.G., 2003.** Molecular systematics of the major lineages of the gastropoden. In: Molecular systematics and phylogeography of mollusks (Lydeard C. & D.R. Lindberg, eds), 140–160. Smithsonian Books, Washington.
- Mangum C.P., 1992.** Respiratory function of the molluscan hemocyanins. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 13: 301-323.
- Markl J., Savel-Niemann A., Wegener-Strake A., S uling M., Schneider A., Gebauer W., Harris R., 1991.** The role of two distinct subunit types in the architecture of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Naturwissenschaften* 78, 512-514.
- Markl J., Decker H., 1992.** Molecular structure of the arthropod hemocyanins. In: Mangum, C.P. (Ed.). Blood and Tissue oxygen carriers. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 13, Springer, Heidelberg, pp. 325-376.
- Markl J., 1996.** Blaues Blut - Struktur, Funktion und Evolution der H mocyanine. *Chemie in unserer Zeit* 30, 6-18.
- Markl J., Lieb B., Gebauer W., Altenhein B., Meissner U., Harris J.R., 2001.** Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127: R3-R9.

- Mazumder B., Seshadri V., Fox P.L., 2003.** Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 28, Issue 2: 91-98.
- Meissner U., Dube P., Harris J.R., Stark H., Markl J., 2000.** Structure of a molluscan hemocyanin didecamer (HtH1 from *Haliotis tuberculata*) at 12 Å resolution by cryoelectron microscopy. *J. Mol. Biol.* 298: 21-34.
- Meissner U., Martin A.G., Schwarz B.O., Stohr M., Gebauer W., Harris J.R., Markl J., 2004.** 3-D reconstruction of hemocyanins and other invertebrate hemolymph proteins by cryo-TEM: an overview. *Micron* 35(1-2):7-9.
- Mignone F., Gissi C., Sabino Liuni S., Pesole G., 2002.** Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology* 3 (3) reviews 4.1-4.10.
- Miller K.I., Schabtach E., van Holde K.E., 1990.** Arrangement of subunits and domains within the *Octopus dofleini* hemocyanin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1496-1500.
- Miller K.I., Cuff M.E., Lang W.F., Varga-Weisz P., Field K.G., van Holde K.E., 1998.** Sequence of the *Octopus dofleini* hemocyanin subunit: structural and evolutionary implications. *J. Mol. Biol.* 278: 827-842.
- Morse D.E., 1990.** Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology. *Bulletin of Marine Science* 46: 465-483.
- Nagai T., Kawabata T.S., 2000.** A Link between Blood Coagulation and Prophenol Oxidase Activation in Arthropod Host Defense. *The Journal of biological chemistry*. Vol. 275, No. 38: 29264-29267.
- Naganuma T., Degnan B.M., Horikoshi K., Morse D.E., 1994.** Myogenesis in primary cell cultures form larvae of the abalone, *Haliotis rufescens*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 131-140.
- Neafsey D.E., Galagan J.E., 2007.** Positive selection for unpreferred codon usage in eukaryotic genomes. *BMC Evolutionary Biology* 7: 119.
- Nilsson I., Whitley P., von Heijne G., 1994.** The COOH-terminal ends of internal signal and signal-anchor sequences are positioned differently in the ER translocase. *J Cell Biol* 126: 1127-32.
- Nott A., Meislin S.H., Moore M.J., 2003.** A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA* 9: 607-617.
- Okusu A., Schwabe E., Eernisse D.J., Giribet G., 2003.** Towards a phylogeny of chitons (Mollusca: Polyplacophoren) based on combined analysis of five molecular loci. *Org. Divers. Evol.* 3: 281- 302.
- Orlova E.V., Dube P., Harris J.R., Beckman E., Zemlin F., Markl J., van Heel M., 1997.** Structure of keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH1) at 15 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. *J. Mol. Biol.* 271: 417-437.
- Passamaneck Y.L., Schander C., Halanych K.M., 2004.** Investigation of molluscan phylogeny using large-subunit and small-subunit nuclear rRNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 32: 25-38.
- Perbrandt M., Guthohrlein E.W., Rypniewski W., Idakieva K., Stoeva S., Voelter W., Genov N., Betzel C., 2003.** The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity. *Biochemistry* 42, 6341-6346.

- Peterson K.J., Lyons J.B., Nowak K.S., Takacs C.M., Wargo M.J., McPeck M.A., 2004.** Estimating metazoan divergence times with a molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(17): 6536-6541.
- Pojeta J.Jr., 1980.** Molluscan phylogeny. *Tul. Stud. Geol. Paleontol.* 16: 55-80.
- Pontrelli L., Sidiropoulos K.G., Adeli K., 2004.** Translational Control of Apolipoprotein B mRNA: Regulation via *Cis* Elements in the 5' and 3' Untranslated Regions. *Biochemistry* 43(21): 6734-6744.
- Prestridge D.S., 1995.** Predicting Pol II Promoter Sequences using Transcription Factor Binding Sites. *J. Mol. Biol.* 249: 923-932.
- Roeder R.G., 1996.** The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci.* (9):327-35.
- Rogozin I.B., Lyons-Weiler J., Koonin E.V., 2000.** Intron sliding in conserved gene Families. *Trends Genet.* 16(10): 430-432.
- Rose A.B., 2002.** Requirements for intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis*. *RNA* 8: 1444-1453.
- Rose A.B., 2004.** The effect of intron location on intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 40: 744-751.
- Roy S.W., 2003.** Recent evidence for the Exon Theory of Genes. *Genetica* 118: 251-266.
- Ruth P., Schipp R., Klussendorf B., 1988.** Cytomorphology and copper content of the basal cells in the midgut gland of *Nautilus* (Cephalopoden, Tetrabranchiata). A contribution to the localization of hemocyanin synthesis. *Zoomorphology* 108: 1-11.
- Ryan M., Terwilliger R.C., Schabtach F., 1985.** Chiton hemocyanin structure. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B: 647-656.
- Sakharkar M.K., Tan T.W., De Souza S.J., 2001.** Generation of a database containing discordant intron positions in eukaryotic genes (MIDB). *Bioinformatics* 17 (8): 671-675.
- Salvato B., Santamaria M., Beltramini M., Alzuet G., Casella L., 1998.** The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: o-diphenol oxidase activity. *Biochemistry* 37: 14065-14077.
- Salvini-Plawen L., 1990.** Origin, phylogeny and classification of the phylum Mollusca. *Iberus* 9: 1-33.
- Salvini-Plawen L., Steiner G., 1996.** Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. In: Taylor, J.D. (Ed.). Origin and evolutionary radiation of the Mollusca. *Oxford Science Publications*, London: 29-53
- Scheltema A.H., 1996.** Phylogenetic position of Sipuncula, Mollusca and the progenetic Aplacophora. Pp. 53-58 in J.D. Taylor, ed. Origin and evolutionary radiation of the Mollusca. *Oxford Science Publications*, London.
- Selvamani M.J.P., Degnan S.M., Paetkau D., Degnan B.M., 2000.** Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reef population of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Molecular Ecology* 9: 1184-1186.

- Senozan N.M., Landrum J., Bonaventura J., Bonaventura C., 1981.** Hemocyanin of the giant keyhole limpet, *Megathura crenulata*. In: Lamy J., Lamy J. (Eds.). Invertebrate Oxygen-binding Proteins. Dekker, New York: 703-717.
- Senozan N.M., Briggs M., 1989.** Hemocyanin levels in the giant keyhole limpet, *Megathura crenulata*, from the coast of California. *Comp. Biochem. Physiol.* 94 A: 195-199.
- Shepherd S.A., Tegner M.J., Guzman Del Prío S.A., 1992.** Abalone of the world: biology, fisheries, and culture. *Fishing News Book*, Oxford.
- Shepherd S.A., McShane P.E., Wells F.E., 1997.** Australasian Abalone. *Molluscan Research* 18: 117-324.
- Siezen R.J., Van Bruggen E.F.J., 1974.** Structure and properties of hemocyanins. XII. Electron microscopy of dissociation products of *Helix pomatia* alpha-hemocyanin: quaternary structure. *J. Mol. Biol.* 90: 77-89.
- Sirenko B.I., 1993.** Revision of the system of the order Chitonida (Mollusca: Polyplacophoren) on the basis of correlation between the type of gills arrangement and the shape of the chorion processes. *Ruthenica* 3: 93-117.
- Sirenko B.I., 1997.** Position in the system and the origin of deep-water chitons of family Ferreiraellidae (Mollusca: Polyplacophoren). *Ruthenica* 7: 77-89.
- Skelding J.M., Newell P.F., 1975.** On the functions of the pore cells in the connective tissue of terrestrial pulmonate molluscs. *Cell Tissue Res.* 156: 381-390.
- Smale, S.T., Baltimore D., 1989.** The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57: 103-113.
- Smale S.T., Schmidt M.C., Berk A.J., Baltimore D., 1990.** Transcriptional activation by Sp 1 as directed through TATA or initiator: Specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4509-4513.
- Sminia T., 1977.** Haemocyanin-producing cells in gastropod molluscs. In: Bannister, J.V., ed.: Structure and function of haemocyanin. Berlin, Springer, pp. 279-288.
- Söhngen S.M., Stahlmann A., Harris J.R., Muller S.A., Engel A., Markl J., 1997.** Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Eur. J. Biochem.* 248: 602-614.
- Söderhall K., Cerenius L., 1998.** Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 23-28.
- Stahlmann A.; Söhngen S.M.; Markl J., 1997.** Die Domänenstruktur der beiden Untereinheiten des Hämocyanins KLH der Schlüssellochschncke *Megathura crenulata*. 90. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Mainz.
- Stasek, C.R., 1972.** The molluscan framework. In: Florkin, M., Scheer, B.T. (Eds.). *Chemical zoology*, Vol.7. *Mollusca*. Academic Press, New York, pp. 1-44.
- Steiner G., Dreyer H., 2003.** *Zool. Scripta* 32: 343-356
- Streit K., 2002.** Sequenzierung am Hämocyanin der großen Schlüssellochschncke *Megathura crenulata*. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

- Streit K., Jackson D., Degnan B.M., Lieb B., 2005.** Developmental expression of two *Haliotis asinina* hemocyanin isoforms. *Differentiation* 73: 341-349.
- Streit K., Geiger D.L., Lieb B. 2006.** Molecular phylogeny and the geographic origin of Haliotidae traced by haemocyanin sequences. *Journal of Molluscan Studies* 72: 105-110.
- Stoeva S., Idakieva K., Genov N., Voelter W., 1997.** Complete amino acid sequence of dioxygen-binding functional unit of the *Rapana thomasi* hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238: 403-410.
- Stoeva S., Idakieva K., Rachev R., Voelter W., Genov N., 1997.** Amino-terminal oxygen-binding functional unit of the *Rapana thomasi* grosse (gastropod) hemocyanin: carbohydrate content, monosaccharide composition and amino acid sequence studies. *Comp. Biochem. Physiol. B* 117: 101-107.
- Stoeva S., Schutz J., Gebauer W., Hundsdorfer T., Manz C., Markl J., Voelter W., 1999.** Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Biochem. Biophys Acta* 1435: 94-109.
- Stoeva S., Idakieva K., Betzel C., Genov N., Voelter W., 2002.** Amino acid sequence and glycosylation of functional unit Rth2-e from *Rapana thomasi* (gastropod) hemocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.* 399: 149-158.
- Stoltzfus A., Logsdon J.M.Jr., Palmer J.D., Doolittle W.F., 1997.** Intron „sliding” and the diversity of intron positions. *Evolution*, Vol. 94: 10739–10744.
- Swerdlow R.D., Ebert R.F., Lee P., Bonaventura C., Miller K.I., 1996.** Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers. *Comp. Biochem. Physiol. B* 113: 537-548.
- Szczesna-Skorupa E., Mead D.A., Kemper B., 1986.** The selection of the first AUG as the initiator of eucaryotic mRNAs translation is favored by a 5'-terminal cap group and a purine in the -3' position. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140(1): 288-293.
- Taylor A.C., Davenport J., Allen J.A., 1995.** Anoxic survival, oxygen consumption and haemocyanin characteristics in the protobranch bivalve *Nucula sulcata* Bronn. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 112A: 333-338.
- Terwilliger N.B., Terwilliger R.C., Meyhofer E., Morse M.P., 1988.** Bivalve hemocyanins - a comparison with other molluscan hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 89: 189-195.
- Terwilliger N.B., 1998.** Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *J. Exp. Biol.* 201: 1085-1098.
- Thiele J.H., 1909-1910.** Revision des Systems der Chitonen. *Zoologica*, Stuttg. 22: 1-132.
- Thiele J.H., 1931.** Handbuch der systematischen Weichtierkunde. Gustav Fischer, Jena.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jean Mougin F., Higgins D.G., 1997.** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.
- Topham R., Tesh S., Westcott A., Cole G., Mercatante D., Kaufman G., Bonaventura C., 1999.** Disulfide bond reduction: A powerful, chemical probe for the study of structure-function relationships in the hemocyanins. *Arch. Biochem. Biophys.* 369: 261-266.

- Vacquier V.D., Lee Y.-H., 1993.** Abalone sperm lysin: unusual mode of evolution of a gamete recognition protein. *Zygote* 1: 181–196.
- van Breemen J.F., Wichertjes T., Muller M.F., van Driel R., van Bruggen E.F., 1975.** Tubular polymers derived from *Helix pomatia* beta-hemocyanin. *Eur. J. Biochem.* 60: 129-135.
- van Bruggen E.R.J., Schutter W.G., van Breemen J.F.L., Bijlholt M.M.C., Wichertjes T., 1989.** Arthropodan and molluscan hemocyanins. In: Harris, J.R. (Ed.). *Electron microscopy of proteins*. Academic Press, New York, pp 1-38.
- van der Velden A.W., Thomas A.A., 1999.** The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31(1): 87-106.
- Vanderzande, M., Gielens, C., Préaux, G., 1990.** Isolation of functional units g and h from the hemocyanin of *Sepia officinalis* and partial amino-acid sequence of functional unit h. In: Préaux, G., Lontie, R. (Eds.). *Invertebrate Dioxygen Carriers*. Leuven University Press, Leuven, 125-129.
- van Gelder C.W.G., Flurkey W.H., Wichers H.J., 1997.** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45: 1309-1323.
- van Heel M., Dube P., 1994.** Quaternary structure of multi-hexameric arthropod hemocyanins. *Micron* 25: 387-418.
- van Holde K.E., Miller K.I., 1985.** Association-dissociation equilibria of *Octopus* hemocyanin. *Biochemistry* 24: 4577-4582.
- van Holde K.E., Miller K.I., Lang W.H., 1992.** Molluscan hemocyanins: structure and function. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 13: 257-300.
- van Holde K.E., Miller K.I., 1995.** Hemocyanins. *Adv. Protein Chem.* 47: 1-81.
- van Holde K.E., Miller K.I., van Olden E., 2000.** Allostery in very large molecular assemblies. *Biophys Chem* 86:165–172 (review).
- van Holde K.E., Miller K.I., Decker H., 2001.** Hemocyanins and invertebrate evolution. *J. Biol. Chem.* 276: 15563-15566.
- van Kuik J.A., van Halbeek H., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G., 1985.** Primary structure of the lowmolecular-weight carbohydrate chains of *Helix pomatia* alpha-hemocyanin. Xylose as a constituent of N-linked oligosaccharides in an animal glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 260: 13984-13988.
- Vitturi R., Colomba M.S., Gianguzza P., Pirrone A.M., 2000a.** Chromosomal Location of Ribosomal DNA (rDNA), (GATA)_n and (TTAGGG)_n Telomeric Repeats in the Neogastropod *Fasciolaria Lignaria* (Mollusca: Prosobranchia). *Genetica*, Vol. 108, No. 3: 253-257.
- Vitturi R., Gianguzza P., Colomba M.S., Jensen K.R., Riggio S., 2000.** Cytogenetics in the sacoglossan *Oxynoe olivacea* (Mollusca: Opisthobranchia): karyotype, chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. *Marine Biology*, Vol. 137, No. 4: 577-582.
- Vitturi R., Colomba M.S., Castriota L., Beltrano A.M., Lannino A., Volpe N., 2002.** Chromosome analysis using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization in *Cerithium ulgatum* (Gastropoden: Cerithiidae). *Hereditas* 137: 101–106.

- Vitturi R., Libertini A., Sineo L., Sparacio I., Iannino A., Gregorini A., Colomba M.S., 2005.** Cytogenetics of the land snails *Cantareus aspersus* and *C. mazzullii* (Mollusca: Gastropoden: Pulmonata). *Micron* 36: 351-357.
- Wang D.Y.-C., Kumar S., Hedges S.B., 1999.** Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc. R. Soc. Lond.* B266: 163-171.
- Wanninger A., Haszprunar G., 2002.** Muscle development in *Antalis entalis* (Mollusca, Scaphopoda) and its significance for scaphopod relationships. *J. Morphol.* 254: 53-64.
- Warén A., 1990.** Ontogenetic changes in the trochoidean (Archaeogastropoden) radula, with some phylogenetic implications. *Zoologica Scripta* 19: 179-187.
- Weeke B., 1973.** Crossed immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.* 2: 47-56.
- Werner T., 1999.** Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mammalian Genome* 10: 168-175.
- Wichertjes T., Gielens C., Schutter W.G., Preaux G., Lontie R., van Bruggen E.F.J., 1986.** The quaternary structure of *Sepia officinalis* haemocyanin. *Biochem. Biophys. Acta* 872: 183-194.
- Wickens M., Anderson P., Jackson R.J., 1997.** Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. In *Current Opinion in Genetics & Development* (Ron Laskey and Matthew P. Scott eds.) Current Biology Ltd., London, U.K., Vol. 7: 220-232.
- Winnepenninckx B., Backeljau T., De Wachter R., 1994.** Small ribosomal subunit RNA and the phylogeny of Mollusca. *Nautilus* 2: 98-110.
- Winnepenninckx B., Steiner G., Backeljau T., De Wachter R., 1998.** Details of gastropod phylogeny inferred from 18S rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9: 55-63.
- Wuhrer M., Robijn M.L.M., Koeleman C.A.M., Balog C.I.A., Geyer R., Deelder A.M., Hokke C.H., 2003.** A novel Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Fuc(α 1-6)-core modification attached to the proximal N-acetylglucosamine of keyhole limpet hemocyanin (KLH) N-glycans. *Biochem. J.* 378: 625-632.
- Wu Q., Krainer A.R., 1999.** AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3225-3236.
- Zielinski S., Sartoris F.J. and Portner H.O., 2001.** Temperature effects on hemocyanin oxygen binding in an antarctic cephalopod. *Biol Bull* 200: 67-76.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Tagungsabstracts

Streit K., Lieb B. and Markl J. (2003). Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH): genes, cDNA and evolution. 96. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Berlin.

Streit K. and Lieb B. (2004). Molecular phylogeny of the Haliotidae traced by hemocyanin sequences: an initial approach. 15. World Congress of Malacology, Perth.

Streit K. and Lieb B. (2005). Duplicated hemocyanin genes are more than just a freak of nature. 98. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft und GEBIN, Bayreuth.

Streit K. and Lieb B. (2005). Differential expression of vetigastropod hemocyanin. Annual Conference of the American Malacological Society and the Western Society of Malacologists, Monterey.

Streit K. and Lieb B. (2006). The gene of *Aplysia californica* hemocyanin: A paradigma of intron evolution. 99. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Münster.

Streit K. and Lieb B. (2006). Hemocyanin genes: How did they evolve? Annual Conference of the American Malacological Society and the Western Society of Malacologists, Seattle.

Streit K., Eernisse D.J. and Lieb B. (2006). Hemocyanin: an appropriate new marker!? Phylogeny of polyplacophorans resolved by hemocyanin genes. Molluscan Forum, London.

Möller V., **Streit K.** and Lieb B. (2007). Phylogenetic and structural aspects of chitons' hemocyanins. 100. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Köln.

Meyer A., **Streit K.**, Kelly R.P., Eernisse D.J. and Lieb B. (2007). Hemocyanin as a promising molecular marker for phylogenetic analyses in chitons (Polyplacophora). 9. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Systematik, Wien.

Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht (siehe Anlagen):

Streit K., Jackson D., Degan B.M. and Lieb B. (2005). Developmental expression of two *Haliotis asinina* hemocyanin isoforms. *Differentiation* 73: 341-349.

Streit K., Geiger D.L. and Lieb B. (2006). Molecular Phylogeny And The Geographic Origin Of Haliotidae Traced By Haemocyanin Sequences. *J Moll Stud* 72: 105-110.

ORIGINAL ARTICLE

Klaus Streit · Daniel Jackson · Bernard M. Degnan ·
Bernhard Lieb

Developmental expression of two *Haliotis asinina* hemocyanin isoforms

Received April 18, 2005; accepted in revised form June 10, 2005

Abstract Hemocyanins are large copper-containing respiratory proteins that play a role in oxygen transport in many molluscs. In some species only one hemocyanin isoform is present while in others two are expressed. The physiological relevance of these isoforms is unclear and the developmental and tissue-specific expression of hemocyanin genes is largely unknown. Here we show that two hemocyanin genes in the gastropod *Haliotis asinina*, which encode *H. asinina* hemocyanin (HaH1) and HaH2 isoforms, are developmentally expressed. These genes initially are expressed in a small number of mesenchyme cells at trochophore and pre-torsional veliger stages, with *HaH1* expression slightly preceding *HaH2*. These cells largely are localized to the visceral mass, although a small number of cells are present in head and foot regions. Following metamorphosis the isoforms show overlapping as well as isoform-specific expression profiles, suggesting some degree of isoform-specific function.

Key words *Haliotis* · hemocyanin · development · expression · *in situ* hybridization

Introduction

Molluscan hemocyanins are copper containing, extracellular glycoproteins that show a characteristic bluish color when oxygenized. They possess a cylindrical barrel-like structure with a diameter of ca. 35 nm and var-

iable lengths (Harris et al., 2000). The basic structure of all known hemocyanins is a decameric molecule with a molecular mass of 3,500–4,000 kDa, depending on the species investigated (van Holde and Miller, 1995; Lamy et al., 1998; Mouche et al., 1999; Meissner et al., 2000). One decamer is formed by five antiparallel dimers that are all homodimers consisting of seven to eight globular domains, named functional units (FU) abcdefg[h] (Markl et al., 2001). Each of these FU contains two copper ions, which reversibly complex one oxygen molecule. Thus ca. 70–80 O₂ molecules can be bound in one decamer. Despite these common characteristics enormous differences exist within molluscan hemocyanins. Early experiments by Herskovits (1988) show extraordinary differences concerning sedimentation characteristics. The latter vary between 51S and 136S mirroring different aggregation states of hemocyanins, which can range from decamers to didecamers and multidecamers. Most information regarding hemocyanins originates from studies on cephalopods [*Octopus dofleini*, *Sepia officinalis*, *Benthocopus* sp., and *Vampyroteuthis infernalis* (van Holde and Miller, 1995; Herskovits, 1988; Mouche et al., 1999)], some chitons [e.g., *Lepidochiton* sp., *Mopalia muscosa*, and *Stenoplax conspicua* (Hamilton et al., 1989; Lambert et al., 1994), bivalves [*Nucula hanleyi* (Lambert et al., 1995)], and gastropods [*Aplysia vaccaria*, *Haliotis tuberculata*, and *Megathura crenulata* (Herskovits et al., 1995; Harris and Markl, 1999; Lieb 2000, 2001, 2004; Markl et al., 2001)]. Under physiological conditions, cephalopod hemocyanins exclusively form decamers. This is probably because of the lack of the last FU-h which only is present in bivalve and gastropod hemocyanins. These molluscan classes can form didecamers, tridecamers, and multidecameric structures. This capability is most probably restricted to specific hemocyanin isoforms co-expressed within the same structure simultaneously. These isoforms have arisen independently during the evolution of the various molluscan orders and classes (Lieb and Markl, 2004) and are sometimes difficult to distinguish from each other (Brouwer et al., 1978;

Klaus Streit · Bernhard Lieb (✉)
Institute of Zoology
Johannes Gutenberg University
D-55099 Mainz, Germany
Tel: +49 6131 3923158
Fax: +49 6131 394652
E-mail: lieb@uni-mainz.de

Daniel Jackson · Bernard M. Degnan
School of Integrative Biology
University of Queensland, Brisbane
Queensland 4072, Australia

Gebauer et al., 1999). Others can easily be separated by immunological methods (Gebauer and Harris, 1999; Keller et al., 1999). The physiological functions of these various isoforms are still a matter of debate. It is known that when the keyhole limpet *Megathura crenulata* is kept in captivity, keyhole limpet hemocyanin type 2 (KLH2) is lacking after a few months, thus leading to the assumption that it does not have an essential role for oxygen delivery. However, further investigations on different isoform functions are still missing. This is most probably because of the lack of hemocyanin expression data. To date expression of a single isoform has been investigated in the cephalopods *Octopus*, *Sepia*, and *Nautilus* (Muzii, 1981; Lang, 1988; Ruth et al., 1996; Beuerlein et al., 2004) and the gastropods *Lymnea stagnalis*, *Helix aspersa*, and *H. tuberculata* (Sminia and Boer, 1973; Sminia and Vlugh-van Dallen, 1977; Albrecht et al., 2001). Cephalopod hemocyanins are expressed in several tissues, varying from the hypobranchial gland in the coleoid cephalopods *Octopus* and *Sepia* to the midgut gland in *Nautilus*, whereas the hemocyanin expressing cells in gastropods represent a specialized cell type, the so-called rhogocytes, which are spread throughout the connective tissue of the whole organism. However, nothing is known about tissue-specific expression of isoforms within these species nor on the ontogeny of hemocyanin-expressing cells and tissues. As gastropods hemocyanins isoforms are more distantly related they lend themselves for spatial expression analyses. Here we investigate the temporal and spatial expression patterns of *H. asinina* hemocyanin isoforms. Previously characterized hemocyanin isoforms isolated from *H. tuberculata* form the basis of this work (Meissner et al., 2000; Lieb et al., 2000, 2001). These studies tend to elucidate the functional significance of two distinct hemocyanin isoforms.

Materials and methods

Animals

H. asinina embryos and larvae were obtained as described in Hinman et al. (2003). All stages were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M (*N*-2-morpholino) propane sulfonic acid (pH 7.5), 2 mM MgSO₄, 1 mM ethyleneglycoltetraacetic acid, 0.5 M NaCl for 1–3 hr at 23°C, stepped into 75% ethanol and stored at –20°C.

Purification of hemolymph

H. asinina hemolymph was collected by dissection of one adult animal. Hemocyanin was isolated by ultracentrifugation followed by dialysis (Keller et al., 1999).

Native-, SDS-PAGE, and immunoelectrophoresis

SDS-PAGE was performed according to Laemmli (1970) and native PAGE was performed in borate-buffered polyacrylamide gels (Markl et al., 1979). Polyclonal rabbit antibodies used for immunoelectro-

phoresis were raised against purified *H. tuberculata* hemocyanin 1 (α -HtH1) and *H. tuberculata* hemocyanin 2 (α -HtH2) by Charles River Deutschland (Kisslegg, Germany). Immunoelectrophoresis was performed as described by Weeke (1973) and Kroll (1973).

Electron microscopy

Negative staining of the purified hemolymph with 2% uranyl acetate containing 1 mM *b*-octylglucopyranoside was performed by the single droplet procedure as described in Harris and Horne (1991).

RNA preparation

RNA was isolated from larvae of different developmental stages and one whole juvenile using the E.Z.N.A. invertebrate RNA Kit from Peqlab (Erlangen, Germany). Control RNA was isolated from adult *H. tuberculata* mantle tissue. Larvae were sonicated in lysis buffer and de-shelled juveniles were homogenized using an Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel, Staufen, Germany). The spin-column preparation was then performed according to the manufacturer's instructions. The bound RNA finally was eluted using DEPC-treated water.

RT-PCR

The "one tube" RT-PCR (Qiagen OneStep RT-PCR, Hilden, Germany) was performed using 100 ng of each specific RNA preparation according to the manufacturer's protocol with Q-solution (supplied with the kit).

DNA electrophoresis, cloning, and sequencing

PCR fragments were resolved on standard 1.8% TBE-buffered agarose gels. DNA extraction was done by using the "spin gel extraction kit" from Qiagen and cloned into Topo TA (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) or sequenced directly. TA-cloned PCR-fragments were verified after transformation into Top10 (Invitrogen) by clone PCR using M13for and M13rev primers. Recombinant plasmids were isolated for sequencing using the plasmid Miniprep Spin Kit from Peqlab.

Sequence analyses

cDNA-containing plasmids were sequenced using M13 forward/reverse primers. Direct sequencing was done with gene specific primers purchased from Sigma-Ark (Darmstadt, Germany). Cycle Sequencing reactions were performed using the Taq Dye Terminator system. Database searches and further analyses of sequences were performed using ExPASy online tools (<http://ca.expasy.org/sitemap.html>) and MrBayes V3.0 (<http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes/info.php>) or the Phylip package (<http://evolution.genetics.washington.edu>).

PCR and probes

cDNA probes were digoxigenin (Dig)-labeled by standard three-step PCR (94°C for 2 min, followed by 35 cycles of 94°C for 10 sec, 53°C for 45 sec and 72°C for 1 min, and a final extension of 10 min at 72°C) using the Dig-labeling Kit (Roche Mannheim, Germany) and gene-specific primers.

Whole-mount *in situ* hybridization (WMISH)

WMISH was performed using Dig-labeled cDNA probes with modifications according to Hinman and Degan (2000). The embryos, larvae and manually de-shelled juveniles were rehydrat-

ed into phosphate-buffered solution (PBS) with 0.1% Tween20. After ProK treatment (20 µg/ml in PBS plus 0.1% Tween20 at 37°C for 10–20 min) specimens were pre-hybridized 5 hr in 50% formamide, 5 × SSC, 5 mM EDTA, 1 × Denhardt's solution, 100 µg/ml heparin, 100 µg/ml tRNA, 0.1% Tween20 at 48°C. Hybridization was performed using the same solution by adding 40 µg/ml Dig-labeled cDNA o/n at 42°C. After this specimens were washed at 50°C twice in 50% formamide, 4 × SSC, 0.1% Tween20, then twice in 50% formamide, 2 × SSC 0.1% Tween20, then twice in 50% formamide, 1 × SSC 0.1% Tween20, for 15 min each, and then stepped into 0.1 M maleic acid, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween20. Antibody incubation for detection procedure was also done o/n, followed by several washing steps (Shain and Zuber, 1996). Staining reactions were done by using NBT/BCIP in glycerol. For documentation, specimens were dehydrated by stepwise ethanol changes, cleared in benzyl benzoate: benzyl alcohol (2:1 v/v) and mounted in 70% glycerol.

Results

As this was the first analysis of hemocyanin isoforms in *H. asinina*, we determined whether these correlated to the well studied hemocyanin of *H. tuberculata* (cf. Lieb and Markl, 2004). The most striking feature of *H. tuberculata* hemocyanin is that two immunologically related isoforms exist of which isoform 1 (HtH1) is able to form didecamers whereas HtH2 is able to form multidecameric aggregates. In electron micrographs (Fig. 1) of *H. asinina* hemocyanin, predominantly didecamers were observed next to occasional multidecameric aggregates occurred, similar to *H. tuberculata* hemocyanin. The two isoforms differed in charge (Fig. 2A), with each isoform having a molecular mass of ca.

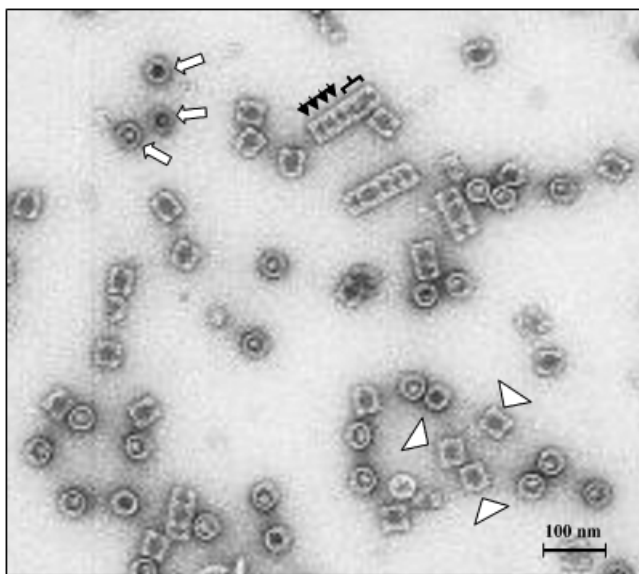


Fig. 1 The electron micrograph of negatively stained *Haliotis asinina* hemocyanin (HaH) predominantly shows didecamers in side view (white arrowheads) and top view (white arrows). Additionally, multidecamers can be observed that consist of a central didecamer (bracket) to which single decamers (small black arrows) are attached.

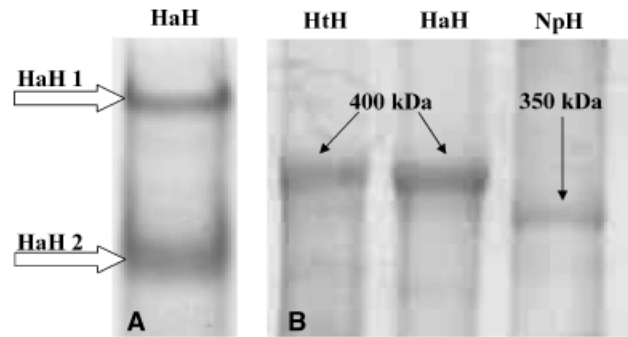


Fig. 2 (A) The Coomassie stained native gel shows that *Haliotis asinina* hemolymph contains at least two different hemocyanin types: HaH1 and HaH2. (B) The SDS-PAGE of the same sample demonstrates that HaH is 400 kDa, the same as *H. tuberculata* hemocyanin (HtH) and larger than the *Nautilus pompilius* hemocyanin (NpH). This indicates that HaH consists of the eight functional units usually observed in gastropods.

400 kDa indicating that, like for HtH1 and HtH2, the subunits contained eight FU (FU-abcdefgh) (Fig. 2B). As for *H. tuberculata* these subunits were immunologically distinguishable (Fig. 3). Additionally, we were able to assign the two precipitates as *H. asinina* type 1 and *H. asinina* type 2 orthologs of HtH1 and HtH2, respectively, by using isoform1- and isoform2-specific antibodies (data not shown). These biochemical studies suggested that the hemocyanins of the two haliotid

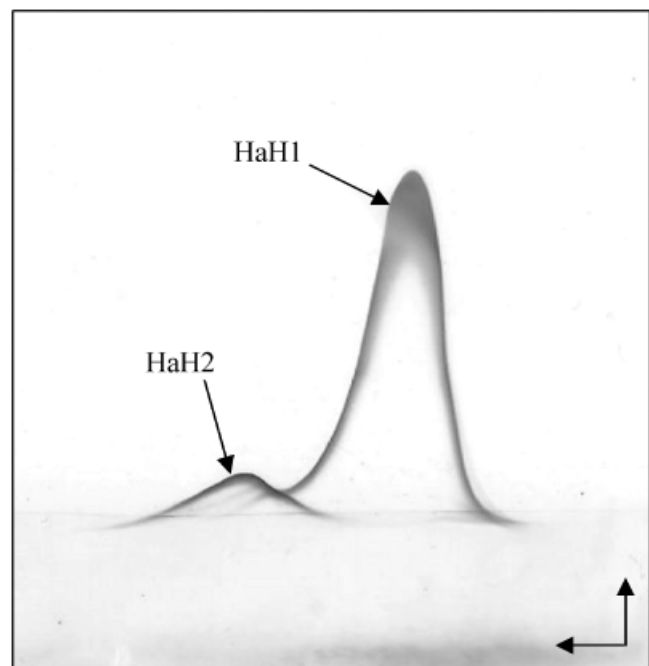
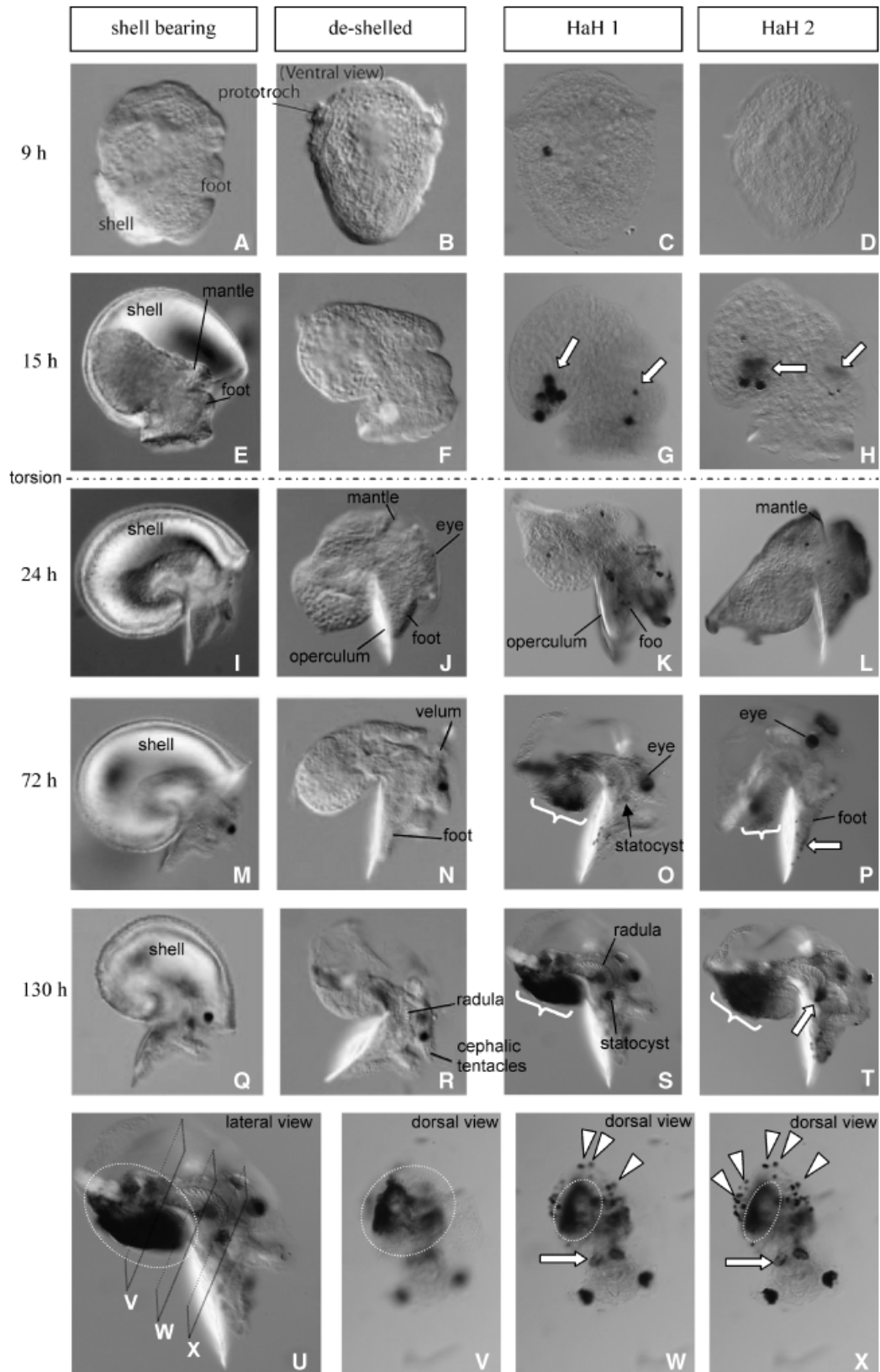


Fig. 3 The immunoelectrophoresis (IE) of purified hemocyanins shows two peaks that correspond to the two immunologically distinguishable isoforms observed within the native PAGE. The two peaks are assigned to the two isoforms 1 and 2 using isoform-specific antibodies raised against *Haliotis tuberculata* hemocyanins.



sion differences were observed within the tentacles (Figs. 6I–6L). HaH1 only was expressed within the cephalic tentacles and the eye stalks (Fig. 6J) and was lacking within epipodial tentacles (Fig. 6I). While HaH2 was highly expressed in the epipodial tentacles (Fig. 6K), transcripts were not detected in the eye stalks and cephalic tentacles (Fig. 6L). While both isoforms were expressed in the gills, HaH1 transcripts were restricted to the tips of the lamellae (Fig. 6N) whereas HaH2 was expressed within the origin of these lamellae (Fig. 6P).

Discussion

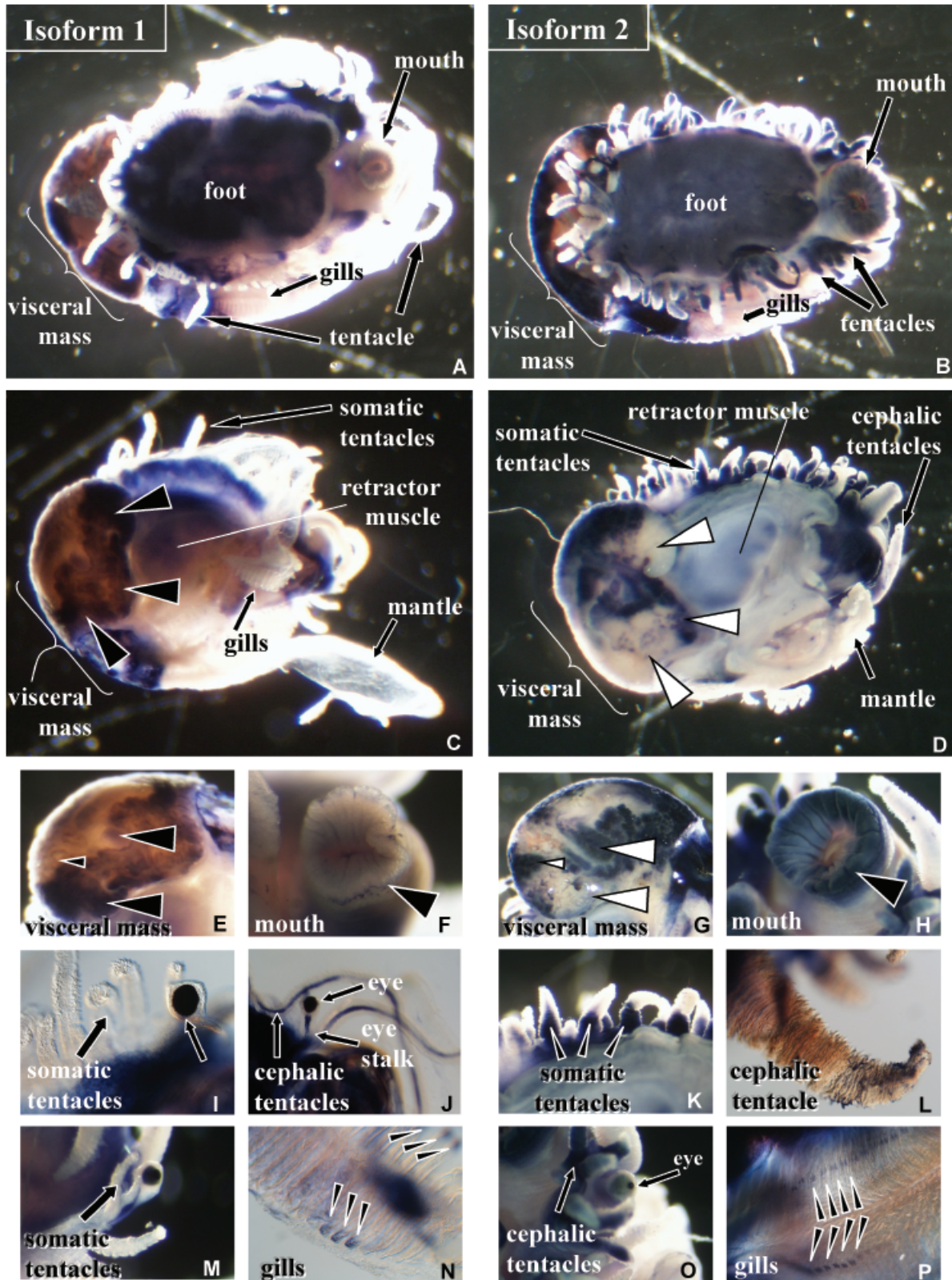
Here we have analyzed hemocyanin gene expression during larval development and the early juvenile stages of *H. asinina* (Vetigastropoda, Haliotidae). We show that the two isoforms are expressed in a range of tissues and developmental stages, which suggests hemocyanin functions beyond oxygen transport in the hemolymph. The differential expression of the two isoforms during development and the juvenile supports the idea that these forms play different physiological roles.

While extensive physiological studies have been made on purified hemocyanins (for review see van Holde and Miller, 1995), the role of different isoforms observed within gastropods remains unclear. Both hemocyanin isoforms of *H. asinina* named HaH1 and HaH2 can be distinguished immunologically, which is in good correlation to previous findings of other vetigastropod hemocyanins (Lieb and Markl, 2004) that show different cooperative characteristics and oxygen-binding affinities (e.g., van Holde et al., 2000; Zielinski et al., 2001; Behrens et al., 2002; Perbandt et al., 2003). Whether this is associated with isoform-specific function remains unknown. One of the first hints to isoform-specific functionality has been provided by the fact that although *Megathura crenulata* hemocyanin type 2 (KLH2) is lost during captivity, the animals remain healthy (Markl et al., 1991). This led to the assumption that KLH1 seems to be sufficient for oxygen supply. However a more recent study shows that when *M. crenulata* is fed a certain diet both hemocyanin isoforms are maintained (Oakes et al., 2004). Hence, the question remains about the functionality and the expression controlling mech-

anisms of these two isoforms. Therefore, we sought to characterize the developmental and spatial expression of the two hemocyanins HaH1 and HaH2 of *H. asinina* in order to determine whether each isoform has unique expression profiles (Figs. 1–3). Evidence that these isoforms are differentially regulated is obtained by comparing protein and transcript ratios. These isoforms show a concentration ratio of ca. 1:2 within the hemolymph whereas mRNA quantities are approximately the same (data not shown). Similar observations have been made for *H. tuberculata* and *M. crenulata* hemocyanin (Söhnngen et al., 1997; Lieb et al., 1999; unpublished data), and it has been speculated, at least for KLH2, that its purpose, beside binding oxygen, might be an amino acid storage function (Markl et al., 1991). Additional support for this came from the fact that hemocyanin in *H. asinina* expression onset takes place ca. 9 hr after fertilization (Fig. 4). These developing trochophore larvae are ca 180 µm in diameter, and small enough to have direct oxygen diffusion. Yet they already express hemocyanin, suggesting an alternative role for hemocyanin than oxygen transport. Later on, hemocyanin mRNA is restricted for a long and crucial developmental period to distinct regions—the visceral mass and the foot—tissues probably having a high metabolic rate and oxygen demand. Expression in other larval tissues, such as the statocysts, suggests that one or both isoforms may have an alternative function, such as acting as an intracellular storage protein. In the larvae isoform-specific patterns—i.e., (i) HaH2 restricted expression to the posterior part of the visceral mass, whereas HaH1 is expressed over most of this mass and (ii) HaH2 expression is concentrated around the mouth region, which also is observed in juveniles. Thus, differential expression of hemocyanin isoforms in *H. asinina* starts before metamorphosis and in some cases is maintained in the juvenile. In the juvenile, it can also be seen that both isoforms are often restricted to distinct areas supporting the idea that each hemocyanin isoform has a unique role beyond the oxygen transport function in the hemolymph. HaH1 and HaH2 are expressed in a wide range of tissues and developmental stages in both overlapping and unique expression patterns. As such we infer that HaH1 and HaH2 may not only represent redundantly expressed proteins, but may also have unique tissue-specific functions yet to be determined.

Fig. 6 Expression of *HaH1* and *HaH2* in 1-month-old juveniles. Within juveniles HaH1 and HaH2 are partly co-expressed within the same tissues, but may also be restricted to distinct and diverse morphological structures. Co-expression mainly can be seen within the foot region (**A, B**) and the retractor muscle (**C, D**). Within other tissues [e.g., the mantle (**A–D**)] hemocyanin mRNA cannot be detected at all. However the majority of tissues exclusively express one isoform. Within the same tissue type (e.g., the visceral mass) distinct regions of hemocyanin expression can be observed. HaH1 is expressed at the tips of the midgut gland [**C** (black arrowheads)] and also heart-bordering regions [**C, E** (black arrowheads)] whereas

HaH 2 is expressed at the remaining regions [**D, G** (white arrowheads)]. Another conspicuous expression difference is that HaH2 is expressed within the mouth region (**B** and **H**) and the epipodial tentacles (**K**), whereas HaH1-expression completely is lacking within these structures (**A, F, I, M**). In contrast HaH1-mRNA can be found within the cephalic tentacles and eye stalks (**A** and **J**) in which vice versa HaH2 mRNA is lacking (**K** and **O**). Another striking, more detailed pattern can be observed within the gills. HaH1 is expressed within the tips of the gills (**N**, arrowheads) whereas HaH2 mRNA only can be found within the inner regions of the gills (**P**, arrowheads).



Acknowledgments We thank Carmel McDougall and Gemma Richards for technical support and great discussions, and Prof. J. Markl for working facilities in Germany. The work has been financially supported by the biosyn company, Fellbach, Germany, by the German Science Foundation (DFG Li998/1-1 to B. Lieb), by the Feldbausch foundation and the Australian Research Council to B. Degnan.

References

- Albrecht, U., Keller, H., Gebauer, W. and Markl, J. (2001) Rhogocytes (pore cells) as the site of hemocyanin biosynthesis in the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Cell Tissue Res* 304: 455–462.
- Behrens, J.W., Elias, J.P., Taylor, H.H. and Weber, R.E. (2002) The archaeogastropod mollusc *Haliotis iris*: tissue and blood metabolites and allosteric regulation of haemocyanin function. *J Exp Biol* 205:253–263.
- Beuerlein, K., Ruth, P., Scholz, F.R., Springer, J., Lieb, B., Gebauer, W., Westermann, B., Schmidtberg, H., von Boletzky, S., Markl, J. and Schipp, R. (2004) Blood cells and the biosynthesis of hemocyanin in *Sepia* embryos. *Micron* 35:115–116.
- Brouwer, M., Ryan, M., Bonaventura, J. and Bonaventura, C. (1978) Functional and structural properties of *Murex fulvescens* hemocyanin: isolation of two different subunits required for reassociation of a molluscan hemocyanin. *Biochemistry* 17: 2810–2815.
- Gebauer, W. and Harris, J.R. (1999) Controlled cleavage of KLH1 and KLH2 by the V8 protease from *Staphylococcus aureus* reassociation, electrophoretic and transmission electron microscopy study of peptide fragments. *Eur J Biochem* 262:166–175.
- Gebauer, W., Stoeva, S., Voelter, W., Dainese, E., Salvato, B., Beltramini, M. and Markl, J. (1999) Hemocyanin subunit organization of the gastropod *Rapana thomasi*. *Arch Biochem Biophys* 372:128–134.
- Hamilton, M.G., Herskovits, T.T., Furcinitti, P.S. and Wall, J.S. (1989) Scanning transmission electron microscopic study of molluscan hemocyanins in various aggregation states: comparison with light scattering molecular weights. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 102:221–228.
- Harris, J.R. and Horne, R.W. (1991) Negative staining. In: Harris, J.R. (ed.). *Electron microscopy in biology*. IRL Press, Oxford, UK, 203–228.
- Harris, J.R. and Markl, J. (1999) *Keyhole limpet* hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* 30:597–623.
- Harris, J.R., Scheffler, D., Gebauer, W., Lehnert, R. and Markl, J. (2000) *Haliotis tuberculata* hemocyanin (HtH): analysis of oligomeric stability of HtH1 and HtH2, and comparison with keyhole limpet hemocyanin KLH1 and KLH2. *Micron* 31:613–622.
- Herskovits, T.T. (1988) Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins. *Comp Biochem Physiol* 91: 597–611.
- Herskovits, T.T., Edwards, M.D. and Hamilton, M.G. (1995) The hemocyanin of the Californian black sea hare, *Aplysia vaccaria* Winkler. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 110: 515–521.
- Hinman, V.F. and Degnan, B.M. (2000) Mox homeobox expression in muscle lineage of the gastropod *Haliotis asinina*: evidence for a conserved role in bilaterian myogenesis. *Dev Genes Evol* 212:141–144.
- Hinman, V.F., O'Brien, E.K., Richards, G.S. and Degnan, B.M. (2003) Expression of anterior Hox genes during larval development of the gastropod *Haliotis asinina*. *Evol Dev* 5:508–521.
- Keller, H., Lieb, B., Altenhein, B., Gebauer, D., Richter, S., Stricker, S. and Markl, J. (1999) Abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocyanin type 1 (HtH1). Organization of the approximately 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units f, g and h. *Eur J Biochem* 264:27–38.
- Kroll, J. (1973) Crossed line immunoelectrophoresis. *Scand J Immunol* 2(Suppl 1): 79–81.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lambert, O., Boisset, N., Taveau, J.C. and Lamy, J.N. (1994) Three-dimensional reconstruction from a frozen-hydrated specimen of the chiton *Lepidochiton* sp. hemocyanin. *J Mol Biol* 244:640–647.
- Lambert, O., Taveau, J.C., Boisset, N. and Lamy, J.N. (1995) Three-dimensional reconstruction of the hemocyanin of the protobranch bivalve mollusc *Nucula hanleyi* from frozen-hydrated specimens. *Arch Biochem Biophys* 319:231–243.
- Lamy, J., You, V., Taveau, J.C., Boisset, N. and Lamy, J.N. (1998) Intramolecular localization of the functional units of *Sepia officinalis* hemocyanin by immunoelectron microscopy. *J Mol Biol* 284:1051–1074.
- Lang, W.H. (1988) cDNA cloning of the *Octopus dofleini* hemocyanin: sequence of the carboxyl-terminal domain. *Biochemistry* 27:7276–7282.
- Lieb, B., Altenhein, B., Lehnert, R., Gebauer, W. and Markl, J. (1999) Subunit organization of the abalone *Haliotis tuberculata* hemocyanin type 2 (HtH2), and the cDNA sequence encoding its functional units d, e, f, g and h. *Eur J Biochem* 265:134–144.
- Lieb, B., Altenhein, B. and Markl, J. (2000) The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*). *J Biol Chem* 275:5675–5681.
- Lieb, B., Altenhein, B., Markl, J., Vincent, A., van Olden, E., van Holde, K.E. and Miller, K.I. (2001) Structures of two molluscan hemocyanin genes: significance for gene evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4546–4551.
- Lieb, B., Boisguérin, V., Gebauer, W. and Markl, J. (2004) cDNA sequence, protein structure, and evolution of the single hemocyanin from *Aplysia californica*, an opisthobranch gastropod. *J Mol Evol* 59:536–545.
- Lieb, B. and Markl, J. (2004) Evolution of molluscan hemocyanins as deduced from DNA sequencing. *Micron* 35:117–119.
- Markl, J., Markl, A., Schartau, W. and Linzen, B. (1979) Subunit heterogeneity of arthropod hemocyanins: I. Chelicerata. *J Comp Physiol* 130B:283–292.
- Markl, J., Meissner, U. and Lieb, B. (2001) Did the 8 MDa molluscan hemocyanin dodecamer evolve from a 500 kDa ring? *Zoology* 104, Suppl. IV p 62 (Proceedings of the 94th Annual Meeting Osnabrück, Germany).
- Markl, J., Savel-Niemann, A., Wegener-Strake, A., Suling, M., Schneider, A., Gebauer, W. and Harris, R. (1991) The role of two distinct subunit types in the architecture of *keyhole limpet* hemocyanin (KLH). *Naturwissenschaften* 78:512–514.
- Meissner, U., Dube, P., Harris, J.R., Stark, H. and Markl, J. (2000) Structure of a molluscan hemocyanin dodecamer (HtH1 from *Haliotis tuberculata*) at 12 angstrom resolution by cryoelectron microscopy. *J Mol Biol* 298:21–34.
- Mouche, F., Boisset, N., Lamy, J., Zal, F. and Lamy, J.N. (1999) Structural comparison of cephalopod hemocyanins: phylogenetic significance. *J Struct Biol* 127:199–212.
- Muzii, E. (1981) Intracellular polymerized haemocyanin in the branchial gland of a cephalopod. *Cell Tissue Res* 220: 435–438.
- Oakes, F.R., McTee, S., McMullen, J., Culver, C.S. and Morse, D.E. (2004) The effect of captivity and diet on KLH isoform ratios in *Megathura crenulata*. *Comp. Biochem Physiol Part A* 138:169–173.
- Perbandt, M., Guthohrlein, E.W., Rypniewski, W., Idakieva, K., Stoeva, S., Voelter, W., Genov, N. and Betzel, C. (2003) The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity. *Biochemistry* 42:6341–6346.
- Ruth, P., Blum, W. and Bille, J. (1996) Immunocytochemical reaction of a hemocyanin antibody in the midgut gland of *Nautilus* (Cephalopoda, Tetrabranchiata). *Experientia* 52:549–553.

- Shain, D.H. and Zuber, M.X. (1996) Sodium dodecyl sulfate (SDS)-based whole-mount in situ hybridization of *Xenopus laevis* embryos. *J Biochem Biophys Methods* 31: 185–188.
- Sminia, T. and Boer, H. (1973) Haemocyanin production in pore cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 145:443–445.
- Sminia, T. and Vlugh-van Dallen, J.E. (1977) Haemocyanin synthesis in pore cells of the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Cell Tissue Res* 183:299–301.
- Söhngen, S.M., Stahlmann, A., Harris, J.R., Muller, S.A., Engel, A. and Markl, J. (1997) Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of *keyhole limpet* haemocyanin (KLH). *Eur J Biochem* 248:602–614.
- van Holde K, E. and Miller, K.I. (1995) Hemocyanins. *Adv Prot Chem* 47:1–81.
- van Holde, K.E., Miller, K.I. and van Olden, E. (2000) Allostery in very large molecular assemblies. *Biophys Chem* 86:165–172 (review).
- Weeke, B. (1973) Crossed immunoelectrophoresis. *Scand J Immunol* 2(Suppl 1): 47–56.
- Zielinski, S., Sartoris, F.J. and Portner, H.O. (2001) Temperature effects on hemocyanin oxygen binding in an antarctic cephalopod. *Biol Bull* 200:67–76.

MOLECULAR PHYLOGENY AND THE GEOGRAPHIC ORIGIN OF HALIOTIDAE TRACED BY HAEMOCYANIN SEQUENCES

KLAUS STREIT¹, DANIEL L. GEIGER² AND BERNHARD LIEB¹

¹*Institute of Zoology, Johannes Gutenberg-University, D-55128 Mainz, Germany;*

²*Santa Barbara Museum of Natural History, 2559 Puesta del Sol Road, Santa Barbara, CA 93105, USA*

(Received 4 March 2005; accepted 4 July 2005)

ABSTRACT

Phylogenetic relationships of 12 species of the vetigastropod family Haliotidae were analysed on the basis of partial haemocyanin coding genes. Both protein-coding and genomic sequence data, of which the latter includes one ancient intron, were analysed. We were able to distinguish two genetically different monophyletic groups with high bootstrap support: (i) the abalones from Europe, South Africa, Australia, Taiwan and Japan group together and are separated from (ii) five California and two Japanese abalones. The usefulness of haemocyanin as a phylogenetic character and the origin of the Haliotidae are discussed.

INTRODUCTION

Molluscan haemocyanins are large oxygen-binding proteins with molecular masses ranging from 3500 kDa to 8 MDa and more (for detailed review, see van Holde & Miller, 1995). The origin of haemocyanin has been calculated to lie within the Precambrian *ca* 700–800 Ma (Lieb, Altenhein & Markl, 2000) before all molluscan classes diverged. Thus, this protein was identified as a promising one to trace molluscan evolution. However, haemocyanin can only be found within cephalopods, chitons, gastropods and protobranch bivalves; it does not occur in other molluscs, e.g. Aplacophora, most bivalves and scaphopods. Our previous work focused on the molecular and biochemical characterization of the haemocyanins of *Megathura crenulata* (Sowerby, 1825) and *Haliotis tuberculata* Linnaeus, 1758. More recently, we started to analyse the evolutionarily informative content of these vetigastropod haemocyanins. Both species express two immunologically distinguishable isoforms, which probably evolved by duplication *ca* 340 ± 50 Ma (Keller *et al.*, 1999; Lieb & Markl, 2004), before Haliotidae and Fissurellidae separated; the two isoforms can clearly be assigned as orthologous or paralogous proteins (see Results). As a consequence, we investigated the hypothesis that the haemocyanins might be a good character to trace the phylogeny of Vetigastropoda.

The clade Vetigastropoda comprises several families: the hydrothermal vent families Lepetodrilidae, Peltospiridae, Neomphalidae, Temnocinlidae, Suttilizonidae and Clypeosectidae, as well as the more shallow water Trochoidea (Trochidae, Turbinidae and allied families), Fissurellidae, Pleurotomariidae, Scissurellidae *s.l.* and Haliotidae. There are some indications that (part of) Cocculiniformia may also belong in Vetigastropoda (Hedegaard, 1997; Colgan, Ponder & Eggler, 2000; Colgan *et al.*, 2003; Geiger & Thacker, 2005; Geiger, Nützel & Sasaki, in review), while others have found them more closely related to Patellogastropoda (McArthur & Harasewych, 2003). Haliotidae are of significant economic importance; over 15 species are fished and farmed (see Shepherd, Tegner & Guzman del Prío, 1992; Shepherd, McShane & Wells, 1997; Fleming & Hone, 1996; Cook *et al.*, 1998; Leighton, 2000). Abalone have also served as model organisms in larval biology (Crofts, 1929, 1937; Lewis, Leighton & Vacquier, 1980; Morse, 1990; Jaeckle & Manahan, 1992; Naganuma *et al.*,

1994) and biomineralization (Dauphin *et al.*, 1989; Fritz *et al.*, 1994).

Beside this economic role, Haliotidae are also the subject of intense investigations regarding their phylogeny and origin (for review see Geiger & Poppe, 2000). A number of attempts have been made to discriminate species and to resolve their phylogeny, using morphology, allozymes, new genetic data and also microsatellite data (Brown, 1991, 1993, 1995; Lee & Vacquier, 1992, 1995; Lee, Ota & Vacquier, 1995; Vacquier & Lee, 1993; Geiger, 1999, 2000). The radula, traditionally used as a character to trace intra-familial phylogeny (Thiele, 1931, but see Geiger & Jansen, 2004; Geiger & Thacker, 2005; Geiger *et al.*, in review, for problems within Vetigastropoda), has limited information for the resolution of relationships within Haliotidae (Geiger, 1999). Two factors obscure the family-level phylogenetic signal in the radula; the plasticity of the radula to feeding requirements, and extensive effects of heterochrony in the various vetigastropod lineages (Geiger & Jansen, 2004; Geiger & Thacker, 2005; Warén, 1990). Other morphological character suits, such as the epipodium and the hypobranchial gland, have been found inadequate to resolve the species-level phylogeny within Haliotidae (Geiger, 1999).

Other molecular data, e.g. allozymes (Brown, 1991, 1993, 1995), the sperm protein lysin (Lee & Vacquier, 1992, 1995), or microsatellites (Evans, White & Elliott, 2000; Selvamani *et al.*, 2000) also seem to resolve some phylogenetic or species-specific relationships, but may prove difficult to expand. Particularly, the homology/orthology of the functional lysin protein in Trochidae and Haliotidae is doubtful (Hellberg & Vacquier, 1999). This problem can be avoided using haemocyanins, of which orthologous or paralogous proteins can readily be identified. We introduce here haemocyanin as a promising new phylogenetic marker, show its utility at the species level, and discuss its prospects for further studies at higher systematic levels.

MATERIAL AND METHODS

DNA extraction

DNA was extracted using the E.Z.N.A. invertebrate DNA extraction kit (PqLab, Germany) according to the manufacturer's instructions or kindly provided by V. Vacquier (Scripps Institute, San Diego, USA).

Correspondence: B. Lieb; e-mail: lieb@uni-mainz.de

List of taxa and GenBank accession numbers

- *Haliotis cracherodii* AJ884596
- *Haliotis wallalensis* AJ884596
- *Haliotis gigantea* AJ749641
- *Haliotis asinina* AJ749642
- *Haliotis diversicolor aquatilis* AJ749643
- *Haliotis discus hannai* AJ749644
- *Haliotis discus supertexta* AJ749645
- *Haliotis fulgens* AJ749646
- *Haliotis rufescens* AJ749647
- *Haliotis corrugata* AJ749648
- *Haliotis midae* AJ749649
- *Haliotis tuberculata* HtH1AJ 252741
- *Haliotis tuberculata* HtH2 AJ 297475
- *Megathura crenulata* KLH1 AJ698339
- *Megathura crenulata* KLH2 AJ698340.

PCR amplification

PCR was performed using a standard three-step protocol and haemocyanin-specific primers (HtH1e for: GTTTTCCATGCTGATGAAC and HtH1 g rev: CCCATGCCTGATGGCCAC) that were designed from the cDNA sequence of *H. tuberculata* haemocyanin type 1 (HtH1, GenBank Acc # AJ 252741). 50 ng of species-specific genomic DNA were used as template in a 50 μ l final volume reaction supplied with 1 μ M primer, 200 μ M dNTP, 3 mM MgCl₂, 5 μ l of 10 times concentrated PCR buffer and 2.5 units recombinant Taq polymerase (Invitrogen, Germany). Samples were denatured for 2 min at 94°C, followed by 45 amplification cycles (10 s at 94°C, 30 s at 55°C, 2 min at 72°C) and final extension for 10 min at 72°C.

Gel electrophoresis, DNA purification and sequencing reactions

PCR products were electrophoresed in a 1.5% agarose gel (1 \times TBE buffer) and gel-extracted using the Qiaquick

gel-extraction kit from Qiagen (Germany). The isolated fragments were cloned into TOPO-XL vectors (Invitrogen, Germany) and transformed into Top10 (Invitrogen, Germany). After recombinant plasmids were isolated by using Miniprep spin columns (Peqlab, Germany), both strands of the inserts were sequenced with standard M13rev or M13 primers, respectively, using the Taq DyeTerminator system (Perkin Elmer).

Sequence analyses

Alignments were created by CLUSTALX (V1.81; Thompson *et al.*, 1997) and optimized manually using GENEDEC (<http://www.psc.edu/biomed/genedec/>). Database searches and further analyses were performed using standard sequence analysis tools, e.g. BLASTN and BLASTX (Altschul *et al.*, 1990; Bairoch & Apweiler, 1999) available at NCBI GenBank biocomputing site, MRBAYES V3.0 (<http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes/info.php>) or the Phylip package (<http://evolution.genetics.washington.edu>).

RESULTS

Based on the assumption that all species of Haliotidae possess haemocyanin as an oxygen-binding protein, we started to verify this by studying 12 different species (for detailed geographic ranges, see Geiger, 2000, and <http://www.vetigastropoda.com/ABMAP/text/index.html>). However, since molluscan haemocyanins are very large, the complete cDNA comprises *ca* 10 kb and the genes are about double in size and, in addition, most often occur as duplicated paralogues, we decided to analyse only a small genomic segment of one isoform, namely isoform 1 (Fig. 1). Using *H. tuberculata* haemocyanin-specific primers we were able to amplify single fragments spanning 522–657 bp. All fragments were cloned, sequenced and *H. tuberculata*-specific primers were omitted from phylogenetic analyses.

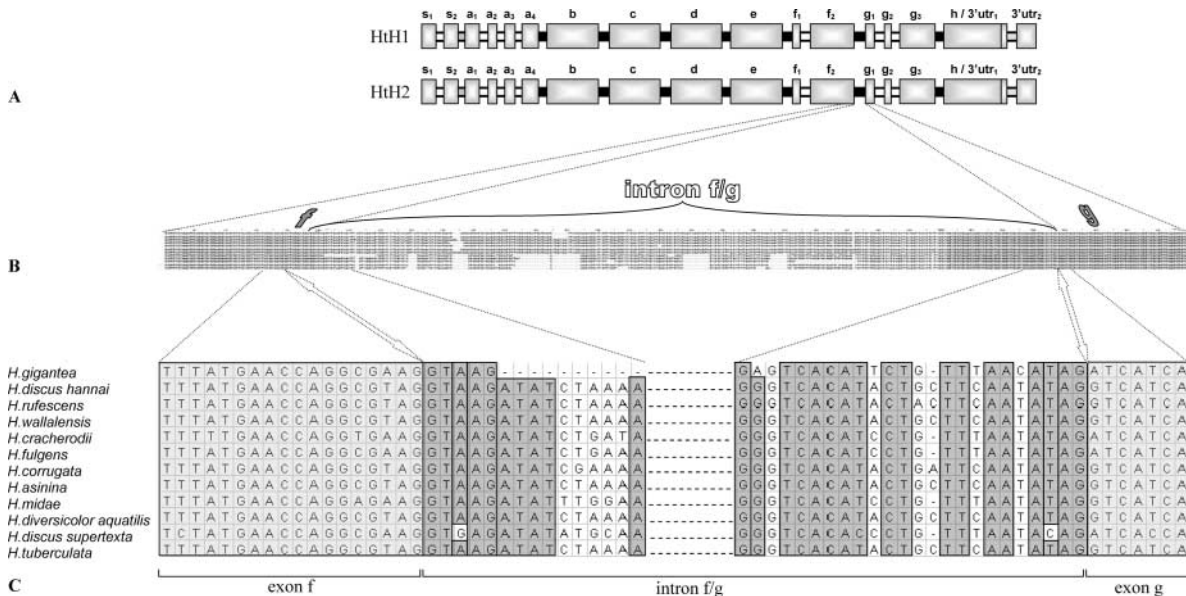


Figure 1. **A.** Schematic of the haemocyanin genes HtH1 and HtH2 of *Haliotis tuberculata*. Black bars represent introns that separate paralogous functional units and can also found within all studied haemocyanins including *Octopus dofleini* haemocyanin (OdH_G). **B.** The alignment of the amplified region of *Haliotis* haemocyanins type 1 representing parts of exon f and g and one ancient intron fg, showing that exons are highly conserved, whereas intronic sequences are more variable but include significant indels. **C.** More detailed view of 5' and 3' splice sites (white arrows). Most follow the protosplice site consensus sequence AG|GT, which also shows a high degree of conservation. Note that *H. asinina* possesses an additional 5' splice site neighbored indel and *H. diversicolor aquatilis* an additional 3' splice site neighbored indel leading to a relatively short intron (the alignment can be obtained on request from the corresponding author).

For all species, we were able to identify two exons separated by one ancestral (Altenhein, Markl & Lieb, 2002, and Discussion) intron (see Fig. 1) of which 5' and 3' splice junctions are highly conserved with respect to position and phase. The deduced primary structures encoded by these exons do not differ in size and are highly conserved; the similarity at the nucleotide level ranges from 80% to 99%. The obtained intron sequences separating the two exons differ significantly in size, ranging from 265 to 399 bp in length. 3' and 5' splice sites are highly conserved, but more 'internally' the intron similarity varies from 58% to 95% (Fig. 1). The smallest intron is represented by the *H. asinina* haemocyanin gene fragment, which is located most upstream to the 5' splice site due to an indel region (Fig. 1). In the other species all indels are located more downstream from the 5' splice site, but are found most often in the first half of all introns (Fig. 1).

To verify that we had amplified only orthologous type 1 haemocyanin genes of all studied members of the Haliotidae, we constructed different phylogenetic trees. We used the Bayesian inference method (ngen = 60,000; burnin = 4,000) with different model settings, e.g. 'jones', 'dayhoff', 'wag' etc. The resulting consensus trees based upon multiple sequence alignments of the *Haliotis* haemocyanin gene sequences, or even exclusively protein coding sequences, all showed the same topology with slightly different supporting values for different nodes (data not shown). Best values for *Haliotis* nodes resulting from gene data analyses are indicated in Figure 2A. For rooting the tree, *Megathura crenulata* haemocyanin type 2 (KLH2)- and *H. tuberculata* haemocyanin type 2 (HtH2)-fragments were used as outgroup. Introns were excluded because they are highly derived and cannot homologize; thus the resulting support value (Fig. 2, white arrow) is derived from exon data exclusively. Nevertheless, the resulting consensus tree shows that the orthologous type 2

haemocyanins group together with high support values and are clearly separated from the paralogous type 2 haemocyanins of *M. crenulata* and other Haliotidae.

DISCUSSION

In our studies we used haemocyanin fragments of 12 members of the Haliotidae to evaluate the usefulness of haemocyanin sequence data for the analysis of their intra-familial phylogenetic relationships. Since it is well known that haemocyanin mostly exists as two different isoforms (van Holde & Miller, 1995; Gebauer *et al.*, 1994) we first had to demonstrate that (i) in all species at least one haemocyanin type exists and (ii) we were able to sequence the orthologous haemocyanin coding sequences.

Nothing was known about the conservation of haemocyanin sequences between species within any molluscan family. The only molecular data known about haemocyanin came from studies of *Enteroctopus dofleini* (Wülker, 1910) in comparison to *H. tuberculata* haemocyanins (Miller *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 1999, Lieb *et al.* 2001). Based on these data, haemocyanins probably evolved prior to the radiation of all molluscan classes, ca 700 Ma within the Precambrian area, and still show a mean similarity of 70% between cephalopods and gastropods (Lieb *et al.*, 2000, 2001). Additionally, it is known that the gene architecture of the two *H. tuberculata* isoforms (HtH1 and HtH2) is highly conserved in terms of the localization and phases of introns (Altenhein *et al.*, 2002). Thus, we speculated that, within Haliotidae, the primary structure of the coding regions as well as intron positions are highly conserved. Therefore, we used HtH1-specific primers spanning an intron (see Fig. 1) to amplify the corresponding gene fragments within 11 other species. For all species we could obtain specific PCR-fragments,

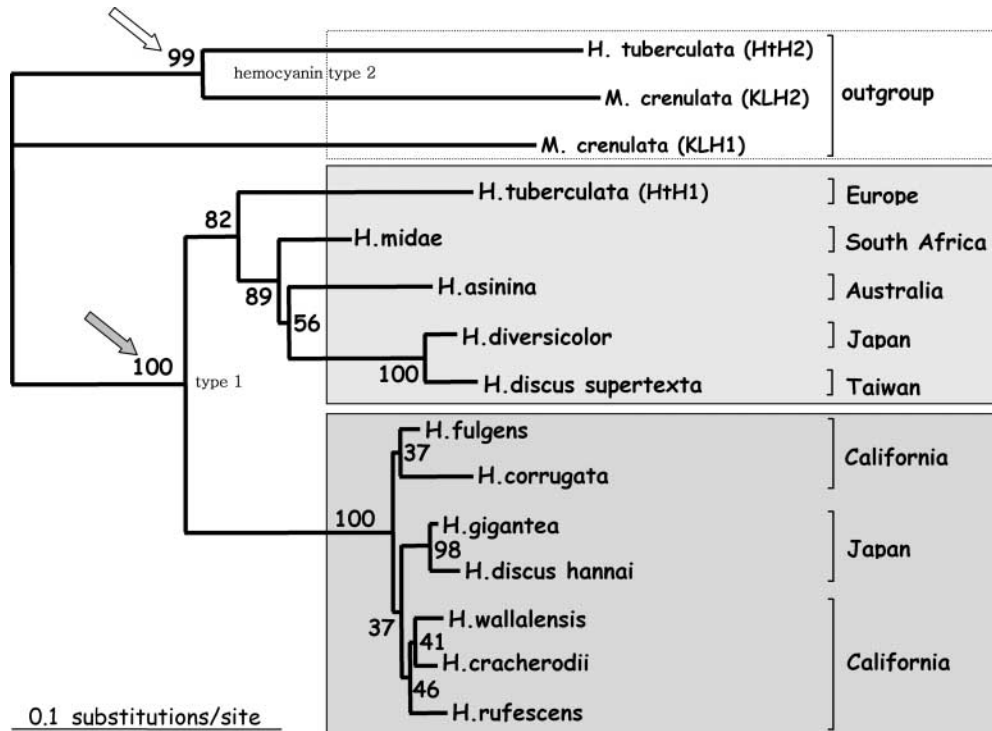


Figure 2. The *Haliotis tuberculata* and *Megathura crenulata* haemocyanin isoforms type 2 (KLH2 and HtH2) are much more closely related than the two haemocyanin isoforms within one species, thus we can speculate that they evolved by gene duplication before the two families separated and in consequence are clearly orthologous proteins. All other sequenced fragments group together as isoform 1 orthologues, while KLH1 forms a basal fissurellid haemocyanin. However, the haemocyanin of *H. tuberculata*, *H. midae*, *H. asinina*, *H. diversicolor* and *H. discus* form a sistergroup to the remaining Haliotidae. *Haliotis tuberculata* probably represents the most basal haemocyanin. For details of methods used to reconstruct the tree, see text.

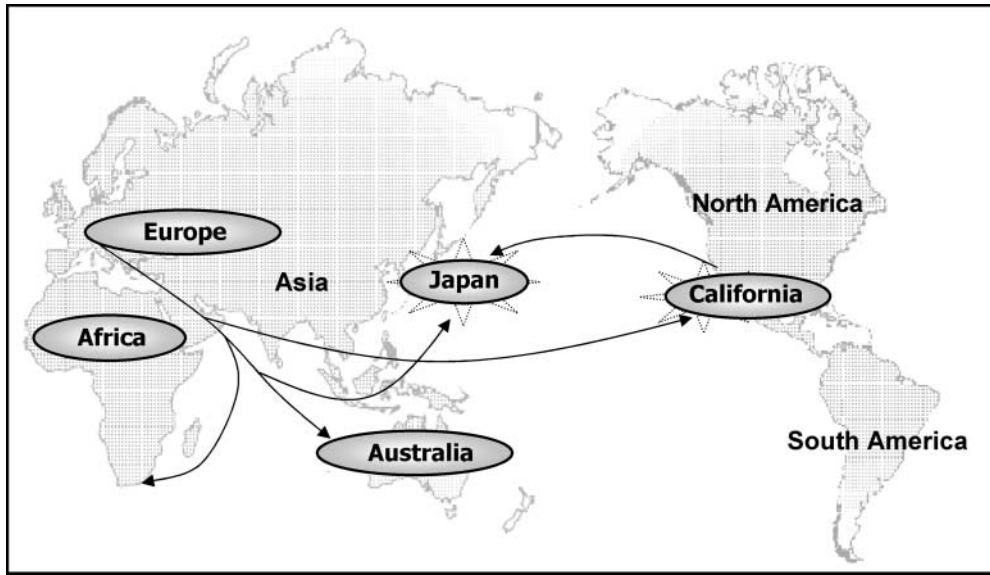


Figure 3. Our findings support that the Haliotidae originated within the Tethys Sea. Starting from there they probably spread around the world eastwards, radiating within the Asian and American Pacific regions.

which varied slightly in length. Additionally, unspecifically amplified byproducts were not obtained in any reaction, supporting our assumption that the haemocyanins of Haliotidae are highly conserved. That conclusion was further supported by more detailed analyses showing that the distances of all obtained haemocyanin sequences, at least for coding regions, ranges between 80–95% at DNA-level and 79–97% for the deduced amino acid sequences. This high degree of identity, at least at the level of amino acids, probably would not be very useful to resolve the phylogenetic relationships of all 12 taxa. However, using the whole genomic DNA-fragments including an ‘ancient’ intron, which is conserved in phase and location throughout all studied Haliotidae (Fig. 1), was very helpful and provided much higher support values for our analyses. It is notable that, according to specific indels, the phylogeny of Haliotidae traced by haemocyanin intron/exon sequences can be subdivided into two major lineages: (i) ‘short’ intron possessing Haliotidae of the European–Australasian area; and (ii) ‘long’ intron possessing Haliotidae, predominantly the North Pacific species. However, these two major clades can also be further subdivided by indels that are located in 3′ splice site direction within the European–Australasian clade and 5′ splice site directed within the North Pacific species, and probably represents the separation caused by their disjunct geographic distribution.

To confirm that our results are genuine and not due to cloning and sequencing different or paralogous isoforms, we used *M. crenulata* haemocyanin (KLH1/2) as well as *H. tuberculata* haemocyanin (HtH2) as outgroups. Since the isoform split occurred before the families diverged, the two corresponding functional units of two different species are much more closely related than the two corresponding regions of two isoforms within the same species (Keller *et al.*, 1999; Lieb & Markl, 2004). Consequently, we could show that we only sequenced haemocyanin type 1 fragments (Fig. 2) for our analyses, which can be seen clearly within the alignment and is also mirrored by the high support values of 99–100 (Fig. 2, arrows). For the rooting of the tree we used KLH1 and also included type 2 haemocyanins to ensure that we used only orthologous sequences. Introns of KLH and HtH were excluded because they show a very high divergence rate and, therefore, cannot be aligned accurately (see Results).

This fact is not surprising, because in our earlier studies, we calculated that the divergence time of Haliotidae and Fissurellidae was *ca* 260 Ma (Lieb & Markl, 2004), which is in good accord with the fossil record of these families (Benton, 1993; Bandel, 1998) and therefore intron sequences had a long time to evolve in different ways. Thus, we are able to distinguish two different clades of Haliotidae, the North Pacific clade and European–Australasian clade using haemocyanin sequences. Within these clades, *H. tuberculata* still possess a basal position whereas the North Pacific clade seems to be a younger offshoot of a last common ancestor, probably shared by the Fissurellidae and Haliotidae *ca* 260 Ma.

Within these clades different species can be distinguished unambiguously the farther these species are separated geographically, e.g. *H. midae* (Africa) is grouped together with *H. asinina* (Australia) and two Asian species (*H. diversicolor* and *H. discus supertexta*), which are supported by 89%, whereas the phylogeny of the two Californian groups is less supported. This is due to a more recent divergence of these North Pacific species as indicated by the short branch lengths, rather than to data conflict (Fig. 1).

The topology obtained here is largely congruent with results from previous studies. The two major clades identified are the North Pacific clade comprising California and Japanese species, and the European–Australasian clade. These two clades have been recovered using allozymes (Brown, 1993), lysin gene (Lee & Vacquier, 1995; Lee *et al.*, 1995), and the combination of allozymes and lysin sequences (Geiger, 2000). Within the North Pacific clade, the basal position of *H. fulgens* and the nested Japanese species also agree with the lysin data and the combined analysis, although the allozyme tree shows somewhat different relationships. The taxon sampling within the European–Australasian clade is still limited and detailed comparisons between the various studies would be inappropriate. The results indicate that haemocyanin is suitable for species level phylogenetic investigations and should be considered as a marker in evolutionary studies. Future work on haemocyanin might include longer fragments, taxon sampling should be increased, and additional outgroups among Vetigastropoda lineages, e.g. Pleurotomariidae, should be included to make the tree more robust.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Bernard Degnan (Queensland University, Australia) and Victor Vacquier (Scripps Institute, USA) for kindly providing *Haliotis* DNA and Jürgen Markl (Johannes Gutenberg University, Germany) for working facilities. This work was supported by the DFG Li998/1-1 and Feldbausch Foundation.

REFERENCES

ALTENHEIN, B., MARKL, J. & LIEB, B. 2002. Gene structure and haemocyanin isoform HtH2 from the mollusc *Haliotis tuberculata* indicate early and late intron hot spots. *Gene*, **301**: 53–60.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**: 403–410.

BAIROCH, A. & APWEILER, R. 1999. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1999. *Nucleic Acids Research*, **27**: 49–54.

BANDEL, K. 1998. Scissurellidae als modell für die variationsbreite einer natürlichen einheit der schlitzbandschnecken (Mollusca, Archaeogastropoda). *Mitteilungen des Geologisch-Paläontologischen Instituts der Universität Hamburg*, **81**: 1–120.

BENTON, M.J. 1993. *The Fossil Record 2*, 125–270. Chapman & Hall, London.

BROWN, L. 1991. Genetic variation and population structure in the blacklip abalone, *Haliotis rubra*. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, **42**: 77–91.

BROWN, L. 1995. Genetic evidence for hybridisation between *Haliotis rubra* and *Haliotis laevis*. *Marine Biology*, **123**: 89–93.

BROWN, L.D. 1993. Biochemical genetics and species relationships within the genus *Haliotis* (Gastropoda: Haliotidae). *Journal of Molluscan Studies*, **59**: 429–443.

COLGAN, D.J., PONDER, W.F. & EGGLER, P.E. 2000. Gastropod evolutionary rates and phylogenetic relationships assessed using partial 28S rDNA and histone H3 sequences. *Zoologica Scripta*, **29**: 29–63.

COLGAN, D.J., PONDER, W.F., BEACHAM, E. & MACARANAS, J.M. 2003. Gastropod phylogeny based on six segments from four genes representing coding or non-coding and mitochondrial or nuclear DNA. *Molluscan Research*, **23**: 123–148.

COOK, P.A., DAVIS, G.E., HAAKER, P.L. & LEIGHTON, D.L. (eds) 1998. Proceedings 3rd International Symposium of Abalone Biology, Fisheries and Culture. *Journal of Shellfish Research*, **17**: 589–904.

CROFTS, D.R. 1929. *Haliotis*. *Liverpool Marine Biology Committee Memoirs*, **29**: 1–174.

CROFTS, D.R. 1937. The development of *Haliotis tuberculata* with special reference to organogenesis during torsion. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, **208**: 219–268.

DAUPHIN, Y., CUIF, J.P., MUTVEI, H. & DENIS, A. 1989. Mineralogy, chemistry and ultrastructure of the external shell-layer in ten species of *Haliotis* with reference to *Haliotis tuberculata* (Mollusca: Archaeogastropoda). *Bulletin of the Geological Institute of the University of Uppsala, New Series*, **15**: 7–38.

EVANS, B., WHITE, R.W.G. & ELLIOTT, N.G. 2000. Characterization of microsatellite loci in the Australian blacklip abalone (*Haliotis rubra*, Leach). *Molecular Ecology*, **9**: 1183–1184.

FLEMING, A.E. & HONE, P.W. (eds) 1996. Abalone culture. Selected papers from the second International Symposium on abalone held in Hobart, Tasmania, Australia, 7–11 February 1994. *Aquaculture*, **140**: i–viii, 1–195.

FRITZ, M., BELCHER, A.M., RADEMACHER, M., WALTERS, D.A., HANSMA, P.K., STURCKY, G.D., MORSE, D.E. & MANN, S. 1994. Flat pearls from biofabrication of organized composite on inorganic substrates. *Nature*, **371**: 49–51.

GEBAUER, W., HARRIS, J.R., HEID, H., SÜLING, M., HILLENBRAND, R., SÖHNGEN, S., WEGENER-STRAKE, A. & MARKL, J. 1994. Quaternary structure, subunits and

domain patterns of two discrete forms of keyhole limpet haemocyanin: KLH1 and KLH2. *Zoology*, **98**: 51–68.

GEIGER, D.L. & THACKER, C.E. 2005. Molecular phylogeny of Vetigastropoda reveals non-monophyletic Scissurellidae, Trochoidea and Fissurelloidea. *Molluscan Research*, **25**: 47–55.

GEIGER, D.L. & POPPE, G.T. 2000. Haliotidae. In: *Conchological Iconography* (G. T. Poppe & K. Groh, eds), 1–135. Conchbooks, Hackenheim.

GEIGER, D.L. & JANSEN, P. 2004. Revision of the Australian species of Anatomidae (Gastropoda: Vetigastropoda). *Zootaxa*, **415**: 1–35.

GEIGER, D.L. 1999. A total evidence cladistic analysis of the Haliotidae (Gastropoda: Vetigastropoda). PhD Thesis, University of Southern California, Los Angeles. Available at <http://www.vetigastropoda.com/abstracts/dissertation.html>.

GEIGER, D.L. 2000. Distribution and biogeography of the Haliotidae (Gastropoda: Vetigastropoda) world-wide. *Bollettino Malacologico*, **35**: 57–120.

GEIGER, D.L., NÜTZEL, A. & SASAKI, T. In press?. Knowledge and uncertainties regarding the phylogeny of Vetigastropoda. In: *Symposium Volume* (W. Ponder & D. Lindberg, eds). University of California Press.

HEDEGAARD, C. 1997. Shell structures of the recent Vetigastropoda. *Journal of Molluscan Studies*, **63**: 369–377.

HELLBERG, M.E. & VACQUIER, V.D. 1999. Rapid evolution of fertilization selectivity and lysin cDNA sequences in teguline gastropods. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 839–848.

JAECKLE, W.B. & MANAHAN, D.T. 1992. Experimental manipulation of the organic composition of seawater: implications for studies of energy budgets in marine invertebrate larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **156**: 273–284.

KELLER, H., LIEB, B., ALTENHEIN, B., GEBAUER, D., RICHTER, S., STRICKER, S. & MARKL, J. 1999. Abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocyanin type 1 (HtH1). Organization of the ≈ 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units f, g and h. *European Journal of Biochemistry*, **264**: 27–38.

LEE, Y.-H. & VACQUIER, V.D. 1995. Evolution and systematics in Haliotidae (Mollusca, Gastropoda): inference from DNA sequences of sperm lysin. *Marine Biology*, **124**: 267–278.

LEE, Y.-H. & VACQUIER, V.D. 1992. The divergence of species specific abalone sperm lysin is promoted by positive Darwinian selection. *Biological Bulletin*, **182**: 97–104.

LEE, Y.-H., OTA, T. & VACQUIER, V.D. 1995. Positive selection is a general phenomenon in the evolution of abalone sperm. *Molecular Biology and Evolution*, **12**: 231–238.

LEIGHTON, D.L. 2000. *The biology and culture of the California abalones*. Dorrance Publishing Company, Pittsburgh, PA.

LEWIS, C.A., LEIGHTON, D.L. & VACQUIER, V.D. 1980. Morphology of abalone spermatozoa before and after the acrosome reaction. *Journal of Ultrastructure Research*, **72**: 39–46.

LIEB, B. & MARKL, J. 2004. Evolution of molluscan haemocyanins as deduced from DNA sequencing. *Micron*, **35**: 117–119.

LIEB, B., ALTENHEIN, B. & MARKL, J. 2000. The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*). *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 5675–5681.

LIEB, B., ALTENHEIN, B., MARKL, J., VINCENT, A., VAN OLDEN, E., VAN HOLDE, K.E. & MILLER, K.I. 2001. Structures of two molluscan haemocyanin genes: significance for gene evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **98**: 4546–4551.

MCARTHUR, A.G. & HARASEWYCH, M.G. 2003. Molecular systematics of the major lineages of the gastropoda. In: *Molecular systematics and phylogeography of mollusks* (Lydeard, C. & D. R. Lindberg, eds), 140–160. Smithsonian Books, Washington.

MILLER, K.I., CUFF, M.E., LANG, W.F., VARGA-WEISZ, P., FIELD, K.G. & VAN HOLDE, K.E. 1998. Sequence of the *Octopus dofleini* haemocyanin subunit: structural and evolutionary implications. *Journal of Molecular Biology*, **278**: 827–842.

MORSE, D.E. 1990. Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology. *Bulletin of Marine Science*, **46**: 465–483.

- NAGANUMA, T., DEGNAN, B.M., HORIKOSHI, K. & MORSE, D.E. 1994. Myogenesis in primary cell cultures from larvae of the abalone, *Haliotis rufescens*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**: 131–140.
- SELVAMANI, M.J.P., DEGNAN, S.M., PAETKAU, D. & DEGNAN, B.M. 2000. Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reef population of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Molecular Ecology*, **9**: 1184–1186.
- SHEPHERD, S.A., TEGNER, M.J. & GUZMAN DEL PRÓO, S.A. (eds) 1992. *Abalone of the world: biology, fisheries, and culture*. Fishing News Book, Oxford.
- SHEPHERD, S.A., MCSHANE, P.E. & WELLS, F.E. (eds) 1997. Australasian Abalone. *Molluscan Research*, **18**: 117–324.
- THIELE, J.H. 1931. *Handbuch der Systematischen Weichtierkunde*. Gustav Fischer, Jena.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEAN MOUGIN, F. & HIGGINS, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4876–4882.
- VACQUIER, V.D. & LEE, Y.-H. 1993. Abalone sperm lysin: unusual mode of evolution of a gamete recognition protein. *Zygote*, **1**: 181–196.
- VAN HOLDE, K.E. & MILLER, K.I. 1995. Haemocyanins. *Advances in Protein Chemistry*, **47**: 1–81.
- WARÉN, A. 1990. Ontogenetic changes in the trochoidean (Archaeogastropoda) radula, with some phylogenetic implications. *Zoologica Scripta*, **19**: 179–187.