

Das Hämocyanin zweier lebender Fossilien:

Nautilus pompilius und *Nucula nucleus*

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades

„D o k t o r

d e r N a t u r w i s s e n s c h a f t e n“

Am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Sandra Bergmann

geb. in Worms

Mainz, 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2004

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| A | <i>Einleitung</i> | 1 |
| 1. | Komplexe Organismen benötigen Sauerstoff-Transportproteine | 1 |
| 2. | Das Hämocyanin der Mollusken – eine allgemeine Einführung | 2 |
| 3. | Die Genstruktur des Hämocyanins ist bei allen Klassen sehr ähnlich | 4 |
| 4. | Die Kristallstruktur der FU-g von <i>Octopus dofleini</i> und FU-e von <i>Rapana thomasiana</i> erhellt die Beziehung zwischen Struktur und Funktion | 5 |
| 5. | Der Biosyntheseort des Mollusken-Hämocyanins | 7 |
| 6. | Besonderheiten des Hämocyanins bei den verschiedenen Klassen | 8 |
| 6.1 | Das Hämocyanin der Polyplacophoren liegt nur als Dekamer vor | 8 |
| 6.2 | Bei den Cephalopoden kann man zwei verschiedene Hämocyanin-Typen unterscheiden | 9 |
| 6.3 | Das Hämocyanin der Gastropoden bildet Didekamere und Multi-Dekamere aus | 11 |
| 6.4 | Hämocyanin kommt auch bei Protobranchia vor | 12 |
| 7. | Ziel der Arbeit | 13 |
| B | <i>Material und Methoden</i> | 14 |
| 1. | Tiere | 14 |
| 1.1 | <i>Nautilus pompilius</i> | 14 |
| 1.2 | <i>Nucula nucleus</i> | 15 |
| 2. | Verwendete Chemikalien und Geräte | 17 |
| 3. | Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen | 17 |
| 4. | Allgemeine mikrobiologische Methoden | 18 |
| 4.1 | Nährmedien und Agarplatten | 18 |
| 4.2 | Bakterienstämme, Phagen und Vektoren | 19 |
| 4.3 | Bakterienkulturen | 20 |
| 5. | Allgemeine molekularbiologische Methoden | 21 |
| 5.1 | Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren | 21 |
| 5.2 | Präzipitation von Nukleinsäuren mit Ethanol | 22 |
| 5.3 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 22 |
| 5.4 | Plasmidisolierung | 22 |
| 5.5 | Restriktionsverdau | 23 |
| 5.6 | Gelelektrophorese..... | 24 |

| | |
|--|------------|
| 5.7 Präparation von Gesamt-RNA | 27 |
| 5.8 Präparation von genomischer DNA | 30 |
| 5.9 PCR-Techniken | 31 |
| 5.10 Klonierung | 40 |
| 5.11 Southern Blot | 43 |
| 5.12 Durchsuchen der genomischen DNA-Bibliothek („ <i>Screening</i> “) | 44 |
| 6. Sequenzanalyse und Phylogenie | 48 |
| 7. Allgemeine proteinbiochemische Methoden | 50 |
| 7.1 Entnahme und Aufbereitung der Hämolymphe | 50 |
| 7.2 Konzentrationsbestimmung und Absorptionsspektrum des Hämocyanins | 50 |
| 7.3 Dissoziation des Mollusken-Hämocyanins in seine Untereinheiten | 50 |
| 7.4 Konzentrierung von Proteinproben | 51 |
| 7.5 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) | 51 |
| 7.6 Western Blot | 56 |
| 7.7 Limitierte proteolytische Spaltung | 59 |
| 7.8 Zweidimensionale Immunelektrophorese | 59 |
| 7.9 Anionenaustauschchromatographie | 62 |
| 7.10 Gelfiltration | 63 |
| 7.11 Lectin-Bindungstest | 64 |
| 8. Transmissions-Elektronenmikroskopie | 65 |
| C Ergebnisse | 67 |
| 1. Ablauf und Strategie der Projekts | 67 |
| 2. Nucula nucleus-Hämocyanin (NnH) | 68 |
| 2.1 Isolierung der DNA-Klone der beiden Isoformen | 68 |
| 2.2 Genomische Sequenz der beiden Isoformen | 75 |
| 2.3 Biochemische Untersuchungen | 77 |
| 3. Nautilus pompilius-Hämocyanin (NpH) | 82 |
| 3.1 Isolierung der Hämocyanin-Klone | 82 |
| 3.2 Genomische Analyse | 86 |
| 3.3 Zusätzliche Sequenzdaten | 88 |
| 3.4 Vergleich zwischen Nautilus pompilius und Nautilus macromphalus | 89 |
| 3.5 Biochemische Untersuchungen | 91 |
| 4. Lektin-Bindungstest | 100 |
| D Diskussion | 101 |

| | |
|--|------------|
| 1. Warum Hämocyanin? | 101 |
| 2. Quartärstrukturen und biochemische Untersuchungen | 101 |
| 2.1 <i>Nucula nucleus</i> | 101 |
| 2.2 <i>Nautilus pompilius</i> | 103 |
| 3. Die Hämocyanin-Sequenz von <i>Nucula nucleus</i> und <i>Nautilus pompilius</i> | 105 |
| 3.1 Besonderheiten bei <i>Nucula nucleus</i> -Hämocyanin | 111 |
| 3.2 Eigentümlichkeiten beim Hämocyanin von <i>Nautilus pompilius</i> | 113 |
| 4. Die Genstruktur des Hämocyanins | 115 |
| 4.1 <i>Nucula nucleus</i> | 118 |
| 4.2 <i>Nautilus pompilius</i> | 118 |
| 4.3 Rückschlüsse auf die Entstehung der Hämocyanin-Untereinheit | 119 |
| 5. Evolution der Mollusken-Hämocyanine | 126 |
| 5.1 Zur Phylogenie des Bivalvia-Hämocyanins | 133 |
| 5.2 Zur Phylogenie des Cephalopoden-Hämocyanins | 133 |
| 5.3 Molekulare Uhr | 134 |
| 6. Evolution von Hämocyanin und Mollusken - ein Vergleich | 137 |
| 7. Ausblick | 144 |
| <i>E Zusammenfassung</i> | 146 |
| <i>F Anhang</i> | 148 |
| 1. Abkürzungen | 148 |
| 2. Abkürzungen der Hämocyanine | 149 |
| 3. Abkürzungscode -Code der Aminosäuren | 149 |
| 4. Der genetische Code für Eukaryoten | 150 |
| 5. IUPAC-Code Nukleinsäuren | 150 |
| 6. EMBL-Accession-Nr. | 151 |
| 7. Verwendete PCR-Primer | 152 |
| 8. DNA-Sequenzen | 154 |
| 9. Internetadressen | 164 |
| <i>G Literatur</i> | 165 |

A Einleitung

1. Komplexe Organismen benötigten Sauerstoff-Transportproteine

Sauerstoff bindende Proteine sind anzestrale Moleküle, die im Präkambrium vor 600 bis 800 Millionen Jahren ihren Ursprung haben (van Holde & Miller, 1995). Sie wurden notwendig, als photosynthetische Organismen die anaerobe Erdatmosphäre in eine aerobe verwandelten. Nun mussten die Lebewesen einerseits Strategien entwickeln, um sich vor dem freiwerdenden Sauerstoff und dessen hochreaktiven Derivaten zu schützen. Andererseits erwarben Einzeller die Fähigkeit, bei der Zellatmung den Sauerstoff als Elektronenendakzeptor in der Atmungskette zu nutzen, dem somit eine entscheidende Rolle für einen effizienten aeroben Metabolismus zukam. Während bei sehr kleinen Tieren der Sauerstoff direkt über die Körperoberfläche zu den stoffwechselaktiven Zellen diffundieren konnte, wurde dieser Transportweg mit zunehmender Größe und Komplexität der Organismen aufgrund des verringerten Oberflächen/Volumen-Verhältnisses unzureichend. Mit der Entwicklung von vaskulären und coelomatischen Kreislaufsystemen wurde die Diffusionsrate des Sauerstoffs erhöht und dieser im gesamten Körper verteilt. Dennoch reichte meist die Menge an physikalisch gelöstem Sauerstoff vor allem bei Tieren mit einer hohen Stoffwechselrate nicht aus. Zur Steigerung der Transporteffizienz entwickelten einige Tierstämme spezielle Sauerstoff-Transportproteine. Um das osmotische Gleichgewicht innerhalb des Körpers nicht zu stören, liegen diese entweder dicht gepackt in Transportzellen (intrazellulär) vor oder bilden große extrazelluläre Molekülaggregate, die frei im Blut bzw. in der Hämolymphe flottieren. Aufgrund ihres aktiven Zentrums, an denen die Beladung mit Sauerstoff stattfindet, kann man drei grundsätzliche Typen von Sauerstoff-Transportproteinen unterscheiden: **Hämoglobin** und **Hämerythrin**, bei denen der Sauerstoff an Eisen gebunden wird, sowie **Hämocyanin** mit Kupfer im aktiven Zentrum. Während das Eisen bei Hämoglobin an ein Porphyrin-Ringsystem koordiniert ist, ist es beim stets intrazellulären Hämerythrin direkt mit dem Protein kovalent verknüpft. Hämoglobin ist sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zu finden. Die beiden Kupferatome im aktiven Zentrum des Hämocyanins verleihen diesem im oxygenierten Zustand eine blaue Farbe. Hämocyanin ist in den beiden großen Tierstämme **Mollusca** und **Arthropoda** zu finden. Obwohl es sich bei den Hämocyaninen der beiden Phyla um extrazelluläre Kupferproteine mit einem nahezu identischen aktiven Zentrum handelt, weisen sie dennoch essentielle Unterschiede in ihrer primären, tertiären und quartären Struktur auf. Sie stammen vermutlich unabhängig voneinander von einem Typ-3-Kupferprotein ab (Markl & Decker, 1992; van Holde & Miller,

1995; Decker & Terwilliger, 2000; Burmester, 2001; Lieb et al., 2001; van Holde et al., 2001). Bei den Arthropoden ist das Hämocyanin aus einem Hexamer bzw. mehreren Hexameren aufgebaut, die jeweils aus sechs Untereinheiten (je 75 kDa) bestehen (Markl & Decker, 1992). Dagegen liegt das Hämocyanin der Mollusken als Hohlzylinder vor, dessen Aufbau im nächsten Abschnitt genauer erläutert wird.

2. Das Hämocyanin der Mollusken – eine allgemeine Einführung

Das Mollusken-Hämocyanin ähnelt vom aktiven Zentrum her den Enzymen **Tyrosinase** (van Gelder et al., 1997) und **Catechol-Oxidase** (Klabunde et al., 1998). Sowohl bei dem Hämocyanin als auch bei diesen Enzymen handelt es sich um Proteine mit einem Typ-3-Kupferzentrum, die sich durch zwei Kupferatome auszeichnen (Gerdemann et al., 2002). Vergleicht man deren Sequenz miteinander, so findet man die höchste Konservierung im Bereich der Kupferbindungsstellen (van Gelder et al., 1997). Wie aus **Abb. 1** deutlich hervorgeht, zeigt auch die dreidimensionale Struktur deckungsgleiche Regionen. Einen weiteren Hinweis auf die enge Verwandtschaft findet man in der schwachen Catecholase-Aktivität des Hämocyanins von *Octopus vulgaris* (Salvato et al., 1998). Allerdings scheint die Fähigkeit dieser Enzyme, Substrat zu binden, beim Hämocyanin verloren gegangen zu sein. Dies kann durch die sterische Blockade von Resten erfolgt sein, die das aktive Zentrum unzugänglich machten (Klabunde et al., 1998).

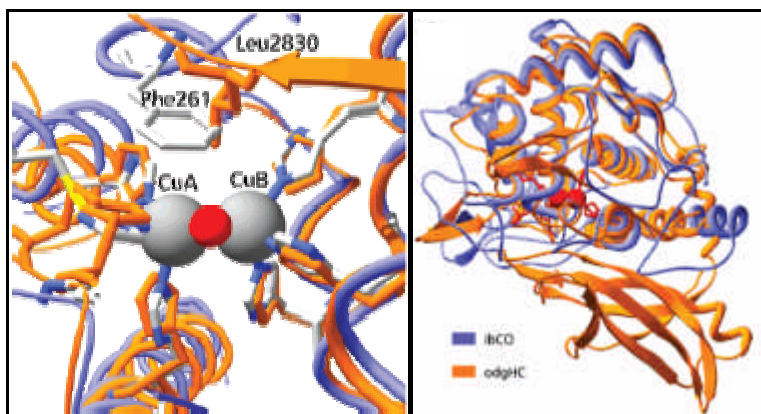


Abb. 1: Vergleich der 3D-Strukturen zweier Typ-3-Kupferproteine.

Die Catechol-Oxidase von *Ipomea batatas* (ibCO) ist blau, die Hämocyanin-Domäne von *Octopus dofleini* (odgHC) orange markiert. In a) ist das Kupferbindungszentrum und in b) die gesamte Tertiärstruktur der beiden Proteine gezeigt (nach Gerdemann et al., 2002).

Bei dem Hämocyanin der Mollusken handelt es sich bei einer Molekülmasse von 4 Millionen Dalton und einem Durchmesser von 35 nm um eines der größten Proteine, die in der Natur vorkommen. Die Grundeinheit dieses Hämocyanins ist ein **Dekamer** (**Abb. 2**), das durch Zusammenlagerung Didekamere oder Multi-Dekamere bilden kann. Das Dekamer ist aus fünf Dimeren aufgebaut, die einen di-pentameren, ringförmigen Hohlzylinder bilden (Siezen &

van Bruggen, 1974; Wichertjes et al., 1986; Miller et al., 1990; Lamy et al., 1993; Lambert et al., 1994; Meissner et al., 2000). Das Monomer selbst besteht aus einer Polypeptidkette mit einer Masse von 350 - 450 kDa, die wiederum in sieben bis acht **funktionelle Domänen** (functional unit? **FU**) unterteilt ist. Diese werden vom N-Terminus zum C-Terminus als FU-a bis FU-g bzw. FU-h bezeichnet und sind über Linkerpeptide von 10 - 15 Aminosäuren miteinander verknüpft (Lang, 1988; Lang & van Holde, 1991). Die Untereinheiten ordnen sich auf antiparallele Weise als Homodimere an, von denen sich fünf wiederum zu einem Dekamer zusammenlagern (Meissner et al., 2000). Diese Assoziation von Monomer zu Dimer und von Dimer zu Dekamer erfordert meist das Vorhandensein von Magnesium-Ionen (Miller et al., 1998).

Mittels hochauflösender 3D-Rekonstruktion (12 Å) wurde die Struktur des Didekamers einer Isoform von *Haliotis tuberculata* (HtH1) aufgeklärt (Meissner et al., 2000).

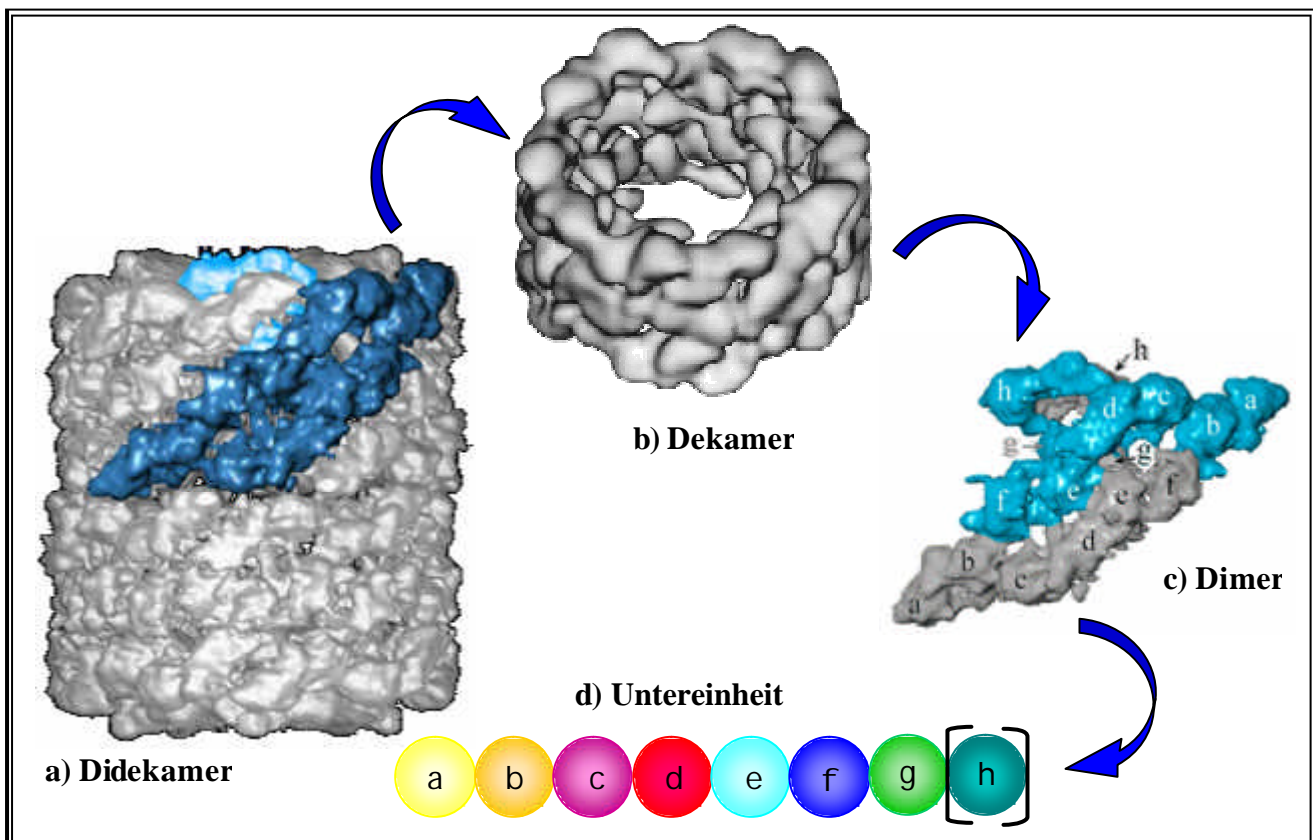


Abb. 2: Verschiedene Strukturebenen des Mollusken-Hämocyanins.

a) Didekamere sind die Grundstruktur des Hämocyanins bei den Gastropoda und Bivalvia, während b) das Dekamer bei Chitonen und Cephalopoden vorkommt. c) Das Dekamer besteht aus fünf Dimeren, die jeweils aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt sind. d) Diese Untereinheit ist aus sieben bzw. acht funktionellen Domänen (a-h) aufgebaut.

(Nach Meissner et al., 2000 und Boisset & Mouche, 2000)

Dabei sind die Domänen FU-*a* bis FU-*f* Bestandteile der Zylinderwand, wobei FU-*abcd* peripher und FU-*ef* zentral im Dekamer liegen. Der Bereich des Kragenkomplexes wird von den Domänen FU-*g* und FU-*h* geformt.

Innerhalb der Domänen ist jedes der beiden Kupferatome (**CuA** und **CuB**) an drei hochkonservierte Histidinreste gebunden (van Holde et al., 1992; Cuff et al., 1998; Miller et al., 1998;). An dieses aktive Zentrum kann sich ein Sauerstoffmolekül reversibel anlagern. Zudem können sich in den Domänen eine oder zwei Bindungsstellen für **Kohlenhydratseitenketten** befinden, die meist N-glykosidisch mit der Polypeptidkette verknüpft werden (Keller et al., 1999; Lieb et al., 1999, 2000) und sich anhand der Motive NXS und NXT ablesen lassen. Der Anteil an Polysacchariden kann bis zu 9 % betragen (van Holde, 1992; Stoeva et al., 1999). Die bisher untersuchten Kohlenhydratseitenketten sind abhängig vom Organismus von unterschiedlicher Zusammensetzung. Bei dem Hämocyanin von *Megathura tuberculata*, das aufgrund seiner immunstimulatorischen Eigenschaften eine Rolle in der Immuntherapie spielt (Harris & Markl, 1999), wurde Mannose, Galactose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin und Fucose nachgewiesen (Stoeva et al., 1999) und diverse Glycane in ihrer Struktur aufgeklärt (Kurokawa et al., 2002). 3-O-Methylhexose und Xylose treten zudem bei den Hämocyaninen von *Helix pomatia* (van Kuik et al., 1985; Lommerse et al., 1997; Gielens et al., 2004) und *Lymnaea stagnalis* (van Kuik et al., 1986) auf.

3. Die Genstruktur des Hämocyanins ist bei allen Klassen sehr ähnlich

Wie ein Vergleich der Genstruktur des Hämocyanins von der Schnecke *Haliothis tuberculata* und der Krake *Octopus dofleini* gezeigt hat (Lieb et al., 2001), ist der Grundaufbau der beiden Gene sehr ähnlich (**Abb. 3**).

Nach der Signalsequenz (s_1 und s_2) am N-Terminus folgen 14 bzw. 10 Exons, die untereinander und teilweise auch innerhalb ihrer Sequenz durch Introns getrennt werden. Am 3'-Ende des letzten Exons liegt ein Stopcodon, an welches sich ein untranslatierter Bereich (3'UTR) anschließt. Dieser endet mit einem Polyadenylierungssignal, welches die Polyadenylierungsstelle in der mRNA markiert.

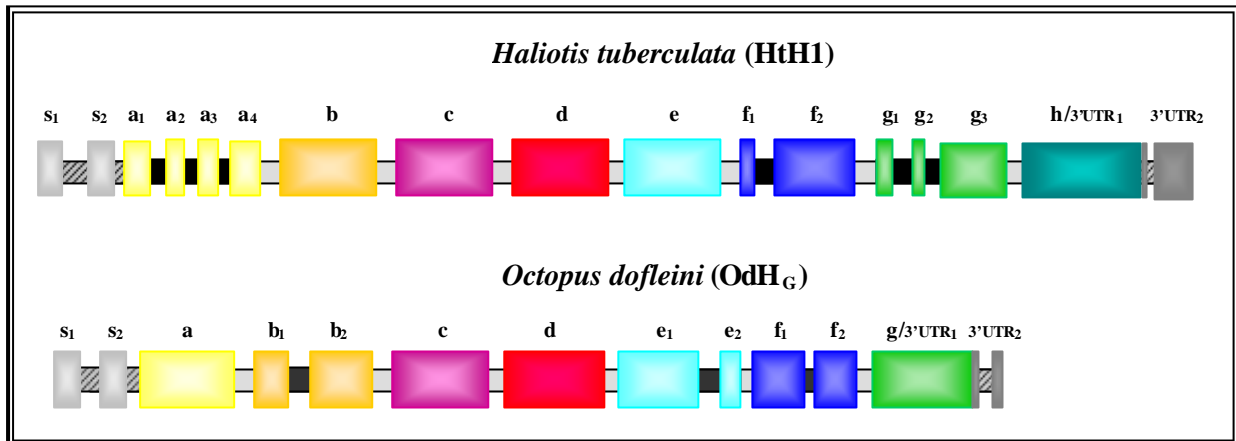


Abb. 3: Genstruktur von HtH1 und OdHG.

Die Exons der verschiedenen FUs sind mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. Interne Introns sind schwarz, Linkerintrons grau markiert. Ein dritter Typ von Introns ist grau-schwarz gestreift markiert. Das Signalpeptid ist mit ‚s‘, die untranslatierte 3‘-Region mit ‚3‘UTR‘ abgekürzt. Nach Lieb et al. (2001).

Aufgrund ihrer Position werden die Introns in zwei verschiedene Typen unterteilt. Die Introns, die sich zwischen den Exons zweier Domänen befinden, werden als **Linkerintrons** bezeichnet. Diese beginnen stets mit den Nukleotiden GT und enden meist mit dem Triplet CAG. Zudem liegen alle Linkerintrons beider Organismen in Phase 1 vor. Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Genstrukturen ist die Lage der **internen Introns**. Diese unterbrechen die codierende Sequenz einiger Domänen in mehrere Exons. Das betrifft bei *Haliothis* die Domänen HtH-a, HtH-f und HtH-g, während bei *Octopus* die Domänen OdH-b, OdH-e und OdH-f getrennt werden. Im Gegensatz zu den Linkerintrons sind die internen Introns somit nicht auf bestimmte Positionen festgelegt und sie kommen zudem in allen drei Phasen vor. Wie bei den Linkerintrons folgen Anfang und Ende fast aller interner Introns der GT/AG-Regel. Ein **dritter Typ von Intron** befindet sich innerhalb des Signalpeptids, zwischen diesem und FU-a und innerhalb des 3‘UTR. Diese werden gesondert aufgeführt, da deren Zuordnung zu Linkerintrons oder internen Introns nicht geklärt ist.

4. Die Kristallstruktur der FU-g von *Octopus dofleini* und FU-e von *Rapana thomasiana* erhellt die Beziehung zwischen Struktur und Funktion

Die Röntgenstrukturanalyse der C-terminalen Domäne FU-g von *Octopus dofleini* (Cuff et al., 1998) lieferte eine detaillierte Vorstellung über die räumliche Anordnung der Polypeptidkette und kann aufgrund von Sequenzhomologien als Modell für alle anderen Domänen herangezogen werden. Dies ist möglich, da nach Sander & Schneider (1991) strukturelle

Homologie zwischen zwei Proteinen vorliegt, wenn die Ähnlichkeit der Sequenzen gleich oder höher der Homologieschwelle einer bestimmten Sequenzlänge ist. Diese Schwelle wird mit über 40 % Sequenzidentität, die FU-g von *Octopus dofleini* im Vergleich mit den FUs anderer Mollusken-Hämocyanine aufweist, in jedem Fall überschritten. Von neuem Datum ist die Strukturanalyse von der ‚Wanddomäne‘ FU-e einer Schnecke, *Rapana thomasiana* (Perbandt et al., 2003). Beide Kristallstrukturen sind in der **Abb. 4** nebeneinander dargestellt.

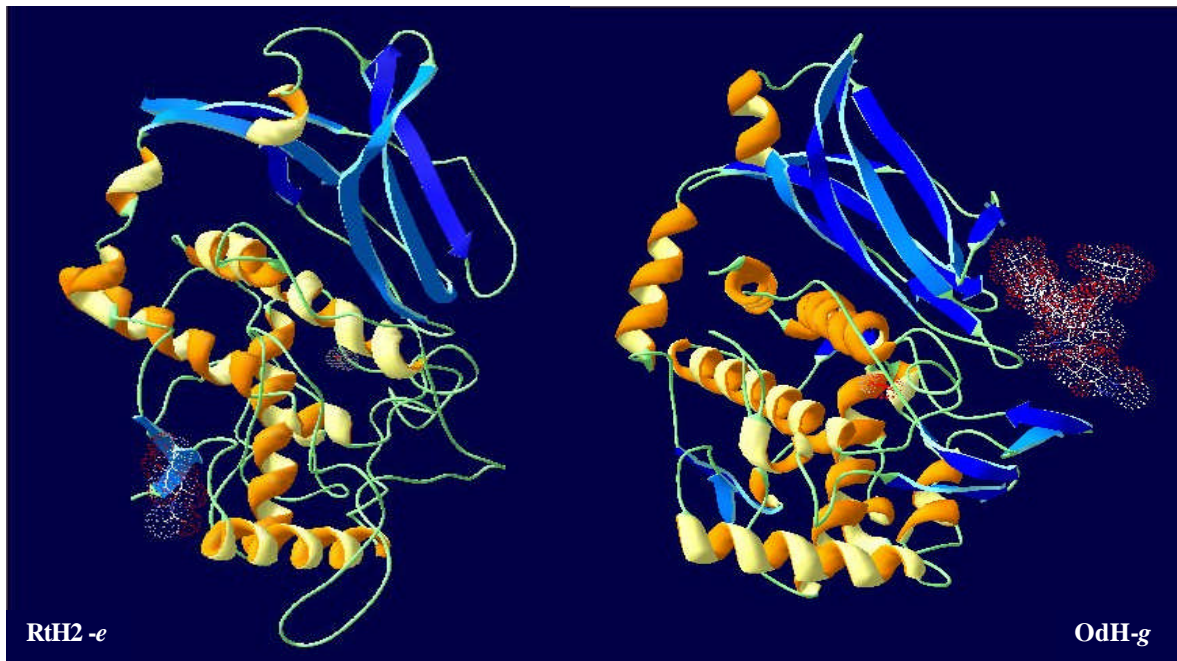


Abb. 4: Kristallstruktur von RfH2-e (*Rapana thomasiana*) und OdH-g (*Octopus dofleini*).

α -Helikale Bereiche sind gelb dargestellt, β -Faltblattstrukturen blau markiert. Bei OdH-g ist zusätzlich eine Asparagin-verknüpfte Glykosylierung zu sehen. Nach Perbandt et al., 2003 und Cuff et al., 1998.

Beide FUs lassen sich in zwei strukturelle Domänen unterteilen: eine **α -helikale Kupferbindungsdomäne** und eine **fünfsträngige β -Sandwich-Domäne**. Dabei stellt erstere den höher konservierten Bereich dar. Wie bereits erwähnt gibt es zwei Kupferbindungsregionen CuA und CuB, in denen sich jeweils drei Histidinreste befinden. Das zweite Histidin der CuA bildet zudem eine **Thioetherbrücke** mit einem Cystein aus, die womöglich einen entscheidenden Beitrag zur kooperativen Modulierung der Sauerstoffaffinität leistet (Gielens et al., 1997). Zudem findet man in allen untersuchten Sequenzen zwei **Disulfidbrücken**, die in unmittelbarer Nähe zu den Histidinen liegen. Die erste Disulfidbrücke stabilisiert eine β - β -Haarnadelstruktur nahe der Kupferbindungsregion CuA. Die zweite heftet eine Schleifenregion an eine α -Helix an, die zwei der drei Histidine von CuB bereitstellt. Die Kristallstruktur von OdH-g weist noch eine weitere Disulfidbrücke

im Bereich der β -Faltblatt-Domäne auf, die allerdings nicht in jeder FU vorhanden ist und somit offenbar keine essentielle Rolle bei der Sauerstoffbindung spielt (Topham et al., 1999). Beim Vergleich zwischen den beiden Kristallstrukturen lassen sich markante Unterschiede feststellen. Zum einen ordnet sich FU-g von *Octopus dofleini* im Kristall zu Dimeren an, während FU-e von *Rapana thomasi* im Kristall einen regulären Zylinder formen. Diese unterschiedliche Zusammenlagerung im Kristall kann mit der strukturellen Organisation des nativen Hämocyanin-Moleküls zusammenhängen. Zum anderen ist bei RtH-e ein Tunnel zu erkennen, der von der Oberfläche zum aktiven Zentrum führt. Da bei RtH-e die Strukturanalyse im desoxygenierten Zustand durchgeführt wurde, während bei OdH-g die Domäne in oxygenierter Form vorlag, lässt der Tunnel auf eine mögliche Funktion bei der Sauerstoffbindung schließen (Perbandt et al., 2003). Ein weiterer Unterschied ist die Lage der Glykosylierungsstellen.

5. Der Biosyntheseort des Mollusken-Hämocyanins

Der Biosyntheseort des Hämocyanins ist bei den einzelnen Organismen verschieden. Während das Hämocyanin von *Octopus* in den **Branchialdrüsen** produziert wird, läuft die Synthese bei *Nautilus* in der **Mitteldarmdrüse** ab (van Holde & Miller, 1995). Neuere Untersuchungen an *Sepia* zeigten, dass neben den Zellen in **Branchialdrüsen**, **Branchialherzen** und **Mitteldarmdrüse** auch **embryonische Blutzellen** für die Biosynthese von Hämocyanin verantwortlich sind (Beuerlein et al., 2000; 2004). Für einige Lungenschnecken werden als Biosyntheseort die **Rhogocyten** (Porenzellen) vermutet, da in diesen intrazelluläre Hämocyanin-Moleküle beobachtet werden konnten (Skelding & Newell, 1975; Sminia, 1977; Haszprunar, 1996). Diese Zellen wurden auch bei den marinen Gastropoden *Haliothis* und *Megathura* gefunden. In-situ-Hybridisierungen an *Haliothis* bestätigten, dass es sich bei den Rhogocyten tatsächlich um den Produktionsort von Hämocyanin handelt (Albrecht et al., 2001). Diese Zellen sind über das ganze Bindegewebe verstreut und vollständig von einer extrazellulären Basallamina-ähnlichen Struktur umschlossen. Charakteristisch sind vesikuläre Einstülpungen, die durch cytoplasmatische Balken überbrückt werden und so eine Pore formen. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Verfügbarkeit von Kupfer durch das Cu-spezifische Metallothionein reguliert wird, da dessen Genexpression auf die Rhogocyten beschränkt ist (Chabicovsky et al, 2003).

6. Besonderheiten des Hämocyanins bei den verschiedenen Klassen

Da innerhalb der Mollusken strukturelle Unterschiede im Aufbau des Hämocyanins auftreten, wird im Folgenden auf die für meine Arbeit relevanten Klassen genauer eingegangen.

6.1 Das Hämocyanin der Polyplacophoren liegt nur als Dekamer vor

Mikroskopische Aufnahmen des Hämocyanins der Käferschnecken (Polyplacophora) stammen von van Bruggen et al. (1981). Bei diesem Hämocyanin handelt es sich um Dekamere, bei denen sich die Kragenregion an einem der beiden Enden befindet (Lambert et al., 1994b) und dem Molekül somit eine asymmetrische Form verleiht (Ryan et al., 1985). Aus der molekularen Masse von 4,20 - 4,47 MDa schlossen Hamilton et al. (1989), dass die Hämocyanin-Untereinheit der Chitonen aus acht funktionellen Domänen besteht. Das Hämocyanin des Polyplacophoren *Acanthochiton fascicularis* (AcH) ist in **Abb. 5** dargestellt.

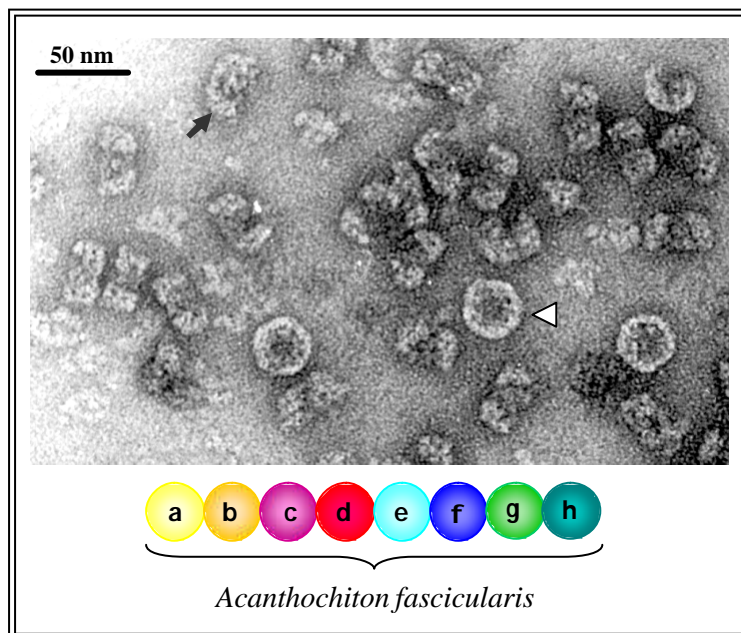


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme und Organisation der Untereinheit des Hämocyanins von *Acanthochiton fascicularis*.

Das Hämocyanin liegt ausschließlich als Dekamer vor. Die Seitenansicht ist mit einem schwarzen Pfeil, die Aufsicht mit einer Pfeilspitze markiert. Zudem besteht eine Untereinheit aus acht funktionellen Domänen.

(Diplomarbeit von Anja Fitsch, 2001)

Das Vorhandensein der C-terminalen FU-*h* wurde mittlerweile auch auf Sequenzebene bestätigt. Vollständige Sequenzdaten eines Polyplacophoren-Hämocyanins liegen zurzeit noch nicht vor, jedoch einzelne Teilsequenzen, die in unserem Arbeitskreis ermittelt wurden.

6.2 Bei den Cephalopoden kann man zwei verschiedene Hämocyanin-Typen unterscheiden

Hämocyanin als respiratorisches Pigment kommt bei allen rezenten Kopffüßern (Cephalopoda) vor. Diese sind in zwei Subklassen untergliedert, den Nautiloidea und den Coleoidea. Letztere bestehen aus den Ordnungen Sepioidea, Teuthoidea, Vampyromorpha und Octopoda.

Bei den Cephalopoden kommt Hämocyanin in Form von Dekameren vor (Cuff et al., 1998). Diese bilden einen Hohlzylinder, der aus einer äußeren Zylinderwand und einem im Inneren gelegenen Kragen besteht (Lamy et al., 1993; Lambert et al., 1994; Lambert et al., 1995a; Mouche et al., 1999).

Anhand der bisherigen Untersuchungen an Cephalopoden-Hämocyanin können zwei verschiedene Typen unterschieden werden (**Abb. 6**). Zum einen findet man in den Ordnungen Vampyromorpha und Octopoda und bei der Subklasse Nautiloidea Dekamere, deren Kragenregion nur von einer FU gebildet wird. Aufgrund dieser Architektur lassen sich Rückschlüsse auf eine Anzahl von sieben FUs in einer Untereinheit schließen, was für das *Octopus dofleini*-Hämocyanin (**OdH**) bereits anhand von Sequenzdaten bestätigt wurde (Miller et al., 1998; Lieb et al., 2001). Das Fehlen der achten Domäne geht mit großer Wahrscheinlichkeit aus einem sekundären Verlust hervor. Dieser Typ des Cephalopoden-Hämocyanins zeichnet sich zudem durch sein Unvermögen aus, stabile Untereinheiten-Dimere zu bilden (Bonaventura et al., 1981; van Holde & Miller, 1985). Bei den anderen beiden Ordnungen der Coleoidea zeigt sich dagegen ein anderes Bild. Hier führt eine zusätzliche Domäne zu einer aus zwei FUs bestehenden Kragenregion, die in ihrer Lokalisierung nicht mit der C-terminalen Domäne in *Octopus* übereinstimmen. Zudem rufen bestimmte Bedingungen stabile Untereinheiten-Dimere hervor, was eine Folge der zusätzlichen FU sein könnte (Chignell et al., 1997).

Immunchemische Untersuchungen am Hämocyanin von *Sepia officinalis* (**SoH**) weisen auf eine interne Verdopplung einer FU hin (Declercq et al., 1990; Vanderzande et al., 1990). Beim Vergleich der einzelnen Domänen mit denen von *Octopus dofleini* zeigte sich, dass die FUs SoH-*abcd* den OdH-Domänen gleicher Position entsprechen. Ebenso weisen die drei C-terminalen FU's ein enges Verwandtschaftsverhältnis auf. Zur fünften Domäne in SoH findet man dagegen kein Analogon bei *Octopus*, weshalb diese auch als SoH-s für „Sepia“ oder „spezial“ bezeichnet wird (Declercq et al., 1990; Loncke et al., 1990; Miller et al., 1998). Allerdings konnte eine immunologische Verwandtschaft mit der benachbarten Domäne SoH-*d* nachgewiesen werden (Loncke et al., 1990). Somit ist die zusätzliche Domäne von *Sepia* klar

von den acht Domänen der Gastropoden zu unterscheiden; sie ist vermutlich nach dem Verlust der FU-*h* innerhalb der Cephalopoden durch interne Verdopplung von SoH-*d* entstanden.

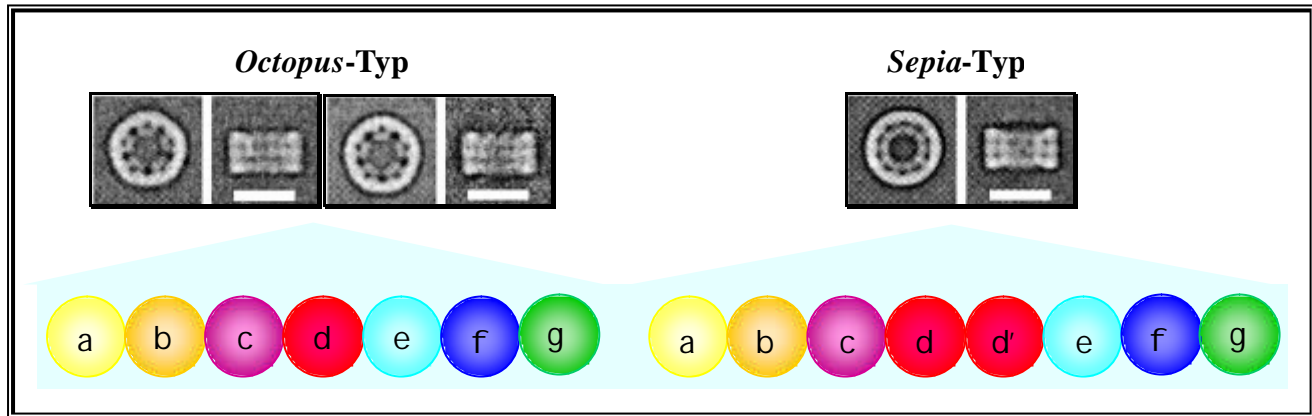


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Hämocyanins und dessen Organisation der Untereinheit vom *Octopus*-Typ und *Sepia*-Typ.

Links sind die Hämocyanine von *Vampyroteuthis* und *Benthoctopus* zu sehen, deren Krage region sich deutlich von dem rechts dargestellten *Sepia*-Hämocyanin unterscheidet. Grund hierfür ist die zusätzliche FU bei *Sepia*, die aus Duplikation von SoH-*d* hervorgegangen ist. EM-Aufnahmen aus Mouche et al., 1999.

Sequenzanalysen an *Octopus dofleini*-Hämocyanin zeigten das Auftreten von zwei Isoformen OdH_A und OdH_G, die eine Identität von 96 % aufweisen (Lang, 1988; Lang & van Holde, 1991; Miller et al., 1998). Während die sehr hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz eher für zwei Allele spricht, konnten auf genomischer Ebene deutliche Unterschiede in den Intronlängen nachgewiesen werden (Miller & van Holde, 2003). Von OdH_G liegt die komplette Sequenz der Hämocyanin-Untereinheit vor. Zwischen den einzelnen FUs liegt die Identität zwischen 41 % und 45 %, wobei die höchste Variabilität im Bereich der Linkerpeptide vorzufinden ist (Miller et al., 1998). Zudem kommen in der Sequenz sieben potentielle Glykosylierungsstellen vor. Ebenfalls zwei Isoformen besitzt das Hämocyanin von *Sepia officinalis* (Préaux et al., unveröffentlicht), die eine Übereinstimmung von 82 % aufweisen.

6.3 Das Hämocyanin der Gastropoden bildet Didekamere und Multi-Dekamere aus

Die Hämocyanine der Schnecken (Gastropoda) treten hauptsächlich als Didekamere mit einer Molekülmasse von 8 Millionen Dalton auf (**Abb. 7**). Auch hier wird das Dekamer von einer Zylinderwand aus den FUs *abcdef* und einer Kragenregion gebildet, wobei letztere von den Domänen *g* und *h* geformt wird (Lieb et al., 1999). Im Gegensatz zu den Cephalopoden ist der Kragen peripher angeordnet und verleiht dem Dekamer somit eine Asymmetrie, indem man eine Kragenseite und eine offene Seite unterscheiden kann (Harris et al., 1992; Orlova et al., 1997; Meissner et al., 2000). Lagern sich nun zwei dieser Dekamere zusammen, so geschieht dies mit der offenen Seite (Terwilliger et al., 1988; van Holde et al., 1992; Herskovits & Hamilton, 1991; Lambert et al., 1995b; Lambert et al., 1995c). Bei einigen marinen Gastropoden treten zudem tubuläre Multi-Dekamere auf (**Abb. 7**), bei denen sich mehrere Dekamere mit der offenen Seite an ein zentrales Didekamer anlagern (Herskovitz & Hamilton, 1991; Markl et al., 1991; Lieb et al., 2004).

Bei Gastropoden-Hämocyaninen findet man je nach Spezies entweder eine Form oder zwei bis drei Isoformen. Während das Hämocyanin des Seehasen *Aplysia californica* (**AcH**) nur als eine Form vorliegt (Herskovits et al., 1995; Lieb et al., 2004), unterscheidet man bei der Schlüssellochschncke *Megathura crenulata* **KLH1** und **KLH2** (Senozan et al., 1981; Senozan & Briggs, 1989; Gebauer et al., 1994; Swerdlow et al., 1996; Söhngen et al., 1997; Harris & Markl, 1999), beim Seeohr *Haliotis tuberculata* **HtH1** und **HtH2** (Keller et al., 1999; Lieb et al., 1999) und bei *Rapana thomasi* **RtH1** und **RtH2** (Idakieva et al., 1993; Gebauer et al., 1999). Bei *Helix pomatia* (**HpH**) und *Helix aspersa* (**HaH**) geht man sogar von drei Isoformen aus (van Breemen et al., 1975; Gielens et al., 1987; Gielens et al., 1990). Im Gegensatz zu *Octopus* und *Sepia* zeigen die beiden Isoformen bei *Megathura* bzw. *Haliotis* eine deutlich geringere Sequenzidentität von nur 65 % (Lieb et al., 2000).

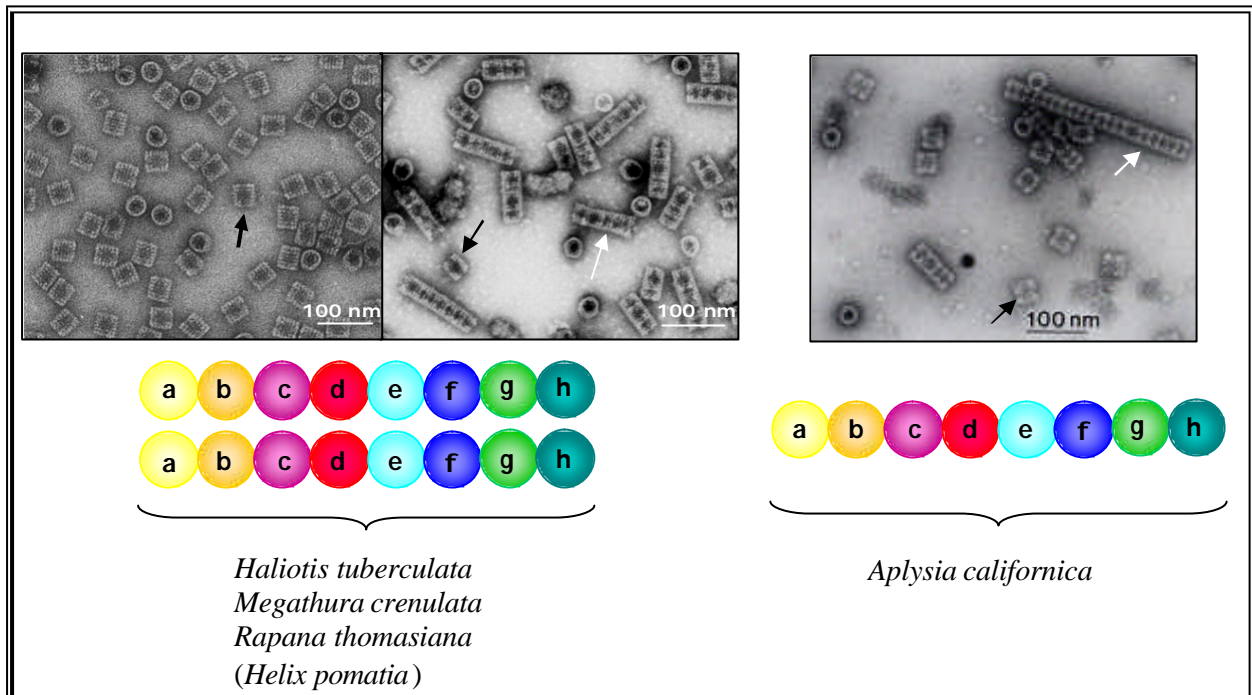


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Organisation der Untereinheit des Hämocyanins von *Megathura crenulata* und *Aplysia californica*.

Links ist das Hämocyanin von *Megathura crenulata* zu sehen, wobei das erste EM-Bild von KLH1 und das zweite von KLH2 stammen. Während KLH1 hauptsächlich als Didekamer (schwarzer Pfeil) vorliegt, bildet KLH2 auch lange Multi-Dekamere (weißer Pfeil) aus. Das Vorkommen von zwei Isoformen ist bei den Gastropoden häufig. Dagegen tritt bei *Aplysia californica* nur eine Form auf. Im Elektronenmikroskop beobachtet man dort neben Didekameren ebenfalls Multi-Dekamere.

6.4 Hämocyanin kommt auch bei Protobranchia vor

Innerhalb der Klasse der Muscheln (Bivalvia) tritt Hämocyanin nur bei den Protobranchia auf. Die anderen Unterklassen besitzen entweder Hämoglobin oder verfügen über kein respiratorisches Protein (van Holde & Miller, 1995). Allerdings wurde auch innerhalb der Protobranchia, nämlich bei der Gattung *Yoldia*, in den Kiemen eine hohe Konzentration an intrazellulärem Hämoglobin gefunden, das möglicherweise unter sauerstoffarmen Bedingungen den aeroben Metabolismus durch Speicherung von Sauerstoff unterstützt (Stead et al., 2003). Nichtsdestotrotz wird vermutet, dass das ursprüngliche Atmungspigment der Bivalvia Hämocyanin ist (Mangum, 1992), zumal die Protobranchia als „lebende Fossilien“ gelten.

Hämocyanin in der Hämolymphe der Protobranchia wurde zum ersten Mal von Morse et al. (1986) bei *Acila castrensis* und *Yoldia limatula* beschrieben und später auch bei weiteren Fiederkiemern nachgewiesen (Mangum et al., 1987; Terwilliger et al., 1988; Herskovits et al.,

1991; Lambert et al., 1995b). Das Hämocyanin der Bivalvia liegt in Form von Didekameran vor, die aus einer zylindrischen Wand und zwei Kragenkomplexen an beiden Enden des Zylinders bestehen und somit dem Gastropoden-Hämocyanin gleicht (Terwilliger et al., 1988; Lambert et al., 1995b). Auf Sequenzebene lagen zu Beginn meiner Doktorarbeit keine Daten bis auf die in meiner Diplomarbeit ermittelten Teilsequenzen vom Hämocyanin der Bivalvia vor.

7. Ziel der Arbeit

Ein Ziel meiner Doktorarbeit war die vollständige Sequenzierung des Hämocyanins des Protobranchiers *Nucula nucleus* (**NnH**) als Fortsetzung meiner Diplomarbeit. Das Interesse an diesem Hämocyanin besteht vor allem darin, dass bisher wie erwähnt noch keine Sequenzdaten von einem Muschel-Hämocyanin vorliegen. Durch einen Sequenzvergleich mit den Hämocyaninen der Schnecke *Haliotis tuberculata* und des Cephalopoden *Octopus dofleini* erhofften wir uns Aufschluss über die phylogenetische Beziehung zwischen den drei Klassen. Weitere Fragen wurden durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Muschel-Hämocyanins aufgeworfen, da es in seiner Quartärstruktur eher dem der Gastropoden als dem der Cephalopoden entspricht. Dieser morphologischen Arbeiten (z.B. Stasek, 1972) widersprechende Befund sollte anhand der Hämocyanin-Sequenz näher analysiert werden.

Eine zweite Aufgabe meiner Arbeit lag in der Untersuchung des *Nautilus pompilius*-Hämocyanins (**NpH**). Bei diesem Organismus handelt es sich ebenfalls um ein „lebendes Fossil“, und er ist aufgrund seiner Ursprünglichkeit ein gefragtes Versuchsobjekt bei phylogenetischen Analysen. Zu Beginn meiner Arbeit waren vom *Nautilus*-Hämocyanin keine Sequenzdaten vorhanden; die bisherigen Untersuchungen erfolgten ausschließlich auf elektronenmikroskopischer und biochemischer Ebene. Ein Vergleich der dreidimensionalen Struktur mit anderen Cephalopoden-Hämocyaninen zeigte eine große Ähnlichkeit zwischen dem *Nautilus pompilius*- und dem *Octopus dofleini*-Hämocyanin, obwohl beide Kopffüßer zu verschiedenen Subklassen gezählt werden. Dagegen weicht die Quartärstruktur des Hämocyanins von *Octopus dofleini* und *Sepia officinalis* wie erwähnt deutlich voneinander ab, obwohl beide der Subklasse Coleoidea angehören. Inwieweit die Verwandtschaftsbeziehung innerhalb der Cephalopoden auf Ebene der Hämocyanin-Sequenzen aufgelöst werden kann, sollte die Untersuchung an *Nautilus pompilius* zeigen.

B Material und Methoden

1. Tiere

1.1 *Nautilus pompilius*

Cephalopoden gehören zu der am höchsten entwickelten Gruppe der Mollusken. Sie leben ausschließlich marin und sind in allen Ozeanen zu finden. Trotz vieler fossiler Belege mit über 10000 Arten umfasst die heute noch lebende Fauna nur noch etwa 700 Spezies. Die einzigen überlebenden Gattungen mit einer äußeren Schale sind *Nautilus* und *Allonautilus*. Die anderen Kopffüßer gehören zur Subklasse Coleoidea und besitzen entweder eine modifizierte innere Schale oder haben diese gänzlich verloren.

Nautilus pompilius („Perlboot“) gehört innerhalb der **Klasse** der **Cephalopoden** zu der **Subklasse Nautiloidea**. Diese wird von der **Ordnung Nautilida** gebildet, die aus einer einzigen **Familie**, den **Nautilidae**, besteht. Die **Gattung Nautilus** umfasst fünf **Arten**, zu denen auch *Nautilus pompilius* gehört (Saunders, 1987).

Die zweite Gattung *Allonautilus* mit einer Art, die auffallende morphologische Unterschiede aufweist, wird zusammen mit der Gattung *Nautilus* zu den Vierkiemern (**Nautiloidea**) zusammengefasst (Bonnaud et al., 2004). Die zweite Subklasse der Kopffüßler wird als Zweikiemer (**Coleoidea**) bezeichnet, zu denen Kraken, Kalmare und Sepien gehören.

Die Nautili sind heute nur noch in den Gewässern des tropischen Westpazifiks zu finden, wo sie in Steilhängen von Korallenriffen leben. Während sie sich in ihren Ruhephasen in etwa 400 - 500 m Tiefe aufhalten, steigen die Nautili in der Nacht in höhere Wasserschichten zur Beutejagd auf.

Nautilus pompilius, das Gemeine Perlboot, ist die häufigste und am weitesten verbreitete Art der Gattung, deren Mitglieder anhand von Gehäusemerkmalen unterschieden werden (**Abb.**



Abb. 8: *Nautilus pompilius*

Das Foto stammt aus der Quelle:
publish.uwo.ca/~jfstaple/

8). *N. pompilius* ist an dem geschlossenen Umbilicus (lat. „Nabel“) zu erkennen, der einen silbernen und schwarz glänzenden Fleck bildet. Im Unterschied zu der Gastropodenschale ist

das Gehäuse der Perlboote in Kompartimente unterteilt und mit Gas gefüllt, wobei das Tier nur in der äußersten (jüngsten) Kammer sitzt. Die Verbindung zwischen den Kammern wird durch eine Röhre und einen Gewebestrang, den Siphunculus, geschaffen. Dieser kontrolliert den Auftrieb, indem er Gas absorbiert oder in die Kammer abgibt. Die Perlboote schwimmen mit einer schaukelnden Bewegung, wobei ihnen ein Trichter als Antrieb dienen kann. Dieser besteht aus einem eingerollten, muskulösen Hautlappen, dessen Ränder nicht verwachsen sind. Durch einen gerichteten Wasserausstoß durch den flexiblen Siphon können sich die Tiere in alle Richtungen fortbewegen. Sie besitzen bis zu hundert saugnapflose Tentakel, die in zwei Kränzen um die Mundöffnung stehen. Diese können auch bei Nicht-Gebrauch in eine sack-ähnliche Hülle zurückgezogen werden. Im Gegensatz zu Kraken und Kalmaren ist der optische Sinn bei den Nautili nur schwach ausgebildet. Das einfache Auge vom Lochkameratyp besitzt keine Linse und ist mit dem Wasser über ein enges Loch direkt verbunden. Aufgrund des schlechten Sehens nehmen die Perlboote ihre Beute möglicherweise über chemische Reize wahr. Nautili sind Räuber, die hauptsächlich Crustaceen und kleine Fische jagen. Zudem ernähren sich die Tiere von Aas jeder Art, finden aber auch in Exuvien die für sie wichtigen Nährstoffe. Sie selbst fallen Drückerfischen, die mit ihrem mächtigen Gebiss die *Nautilus*-Schale zerbeißen können, und anderen Riffbewohnern zum Opfer. Auch Kraken machen Jagd auf *Nautilus* und bohren seine Schale an, um ihn anschließend mit Verdauungssaft zu lähmen.

Unser Versuchstier stammte aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schipp vom Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie der Justus-Liebig-Universität in Giessen. Das Gewebe wurde in unserem Institut bei -80 °C in der Gefriertruhe gelagert, die Hämolymphe bei -4 °C aufbewahrt.

1.2 *Nucula nucleus*

Die Untergliederung innerhalb der Klasse der Muscheln ist heute immer noch ein viel diskutiertes Thema und es wurden bisher vielerlei unterschiedliche Einteilungen unternommen. Die folgende ist die am meisten anerkannte, die auf morphologischen Untersuchungen basiert. Hierbei werden die Bivalvia in fünf Subklassen differenziert: Protobranchia, Pteriomorpha, Paleoheterodonta, Heterodonta und Anomalodesmata.

Nucula nucleus gehört zu der als sehr ursprünglich geltenden **Subklasse Protobranchia**. Diese umfasst die beiden **Ordnungen Solemyoidea** und **Nuculoidea**, wobei letztere aus den **Superfamilien** Nuculanoidea und **Nuculoidea** besteht. Innerhalb der Nuculoidea gibt es

neben den Pristoglomidae die **Familie** der **Nuculidae**. Eine der drei **Gattungen** von den Nuculidae ist *Nucula*, aus der die **Art** *Nucula nucleus* hervorgeht.

Die Protobranchia umfassen mehr als 600 Spezies und gehören unter anderem zu den stammesgeschichtlich ältesten Muscheln in der Tiefsee (Taylor et al., 1995). Sie heben sich von den anderen Subklassen der Bivalvia durch die Form ihrer Kiemen ab, deren paarige Fiederkiemen jeweils aus einem Schaft mit mehreren Kiemenblättchen bestehen. Es sind relativ kleine Muscheln, die sehr konserviert in ihrer Form sind. Diese Gruppe ist von besonderem ökologischen Interesse, da ihre Ernährung und Fortbewegung die Sedimentstruktur beeinflusst. Das lecithotrophe Larvenstadium Pericalymma (Hüllglockenlarve), bei dem sich die Larve nur von Dotter ernährt, ist einzigartig unter den Muscheln. Die Lebenserwartung beträgt etwa ein bis zwei Dekaden, wobei Tiefseebewohner auch länger leben können. Am Boden lebende Fische, Seesterne und Gastropoden sind die Hauptfeinde der Protobranchia.



Abb. 9: Muschelschale von *Nucula nucleus*

Links ist die Außenansicht, rechts das Schaleninnere abgebildet. Die Fotos stammen aus folgender Quelle:

www.eumed.net/malakos/Images/Nucula_nucleus.jpg

Nucula nucleus, die Gemeine Nussmuschel, kommt in der Nordsee, im Ostatlantik von Norwegen bis ins Mittelmeer, im schwarzen Meer und in Westafrika vor (**Abb. 9**). Dort lebt die Muschel dicht unter der Oberfläche des Meeresbodens in grobem Sand und Schlick in einer Tiefe von 10 -1000 m, wobei sie vielen Plattfischen als Nahrung dient. Ähnlich wie Schnecken besitzt *Nucula* einen echten Kriechfuß. Als Anpassung an den weichen Boden ist ihre Fußsohle an der Endscheibe gezackt. Wird der Fuß in den Boden gestoßen und schwillt dort mittels des Blutdrucks an, so wirkt er wie ein Anker und der Körper kann nachgezogen werden. Die Nahrungsaufnahme erfolgt hauptsächlich über Mundlappentaster, bei denen es sich um bewimperte Fortsätze der Mundlappen handelt. Mit ihnen nimmt die Muschel Protozoen, Eier, Larven, Algen, aber auch Detritus auf, was anschließend über eine Wimpernrinne zur Mundöffnung gelangt. Zudem filtert sie durch Wimpernschlag Nahrungspartikel aus dem am Vorderende eintretenden Wasserstrom, der dann weiter durch die Mantelhöhle fließt und am Hinterende ausgestoßen wird.

Die hier verwendeten Organismen stammten von der biologischen Station in Roscoff (Frankreich), wo sie an der Atlantikküste gedreht wurden. Sie wurden in unserem Institut bei -80 °C in der Gefriertruhe gelagert.

2. *Verwendete Chemikalien und Geräte*

Die hier verwendeten Laborchemikalien, die in Analysequalität erhalten wurden, stammten von den Firmen Roche (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), ICN Biomedicals (Meckenheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Handelsübliche Petrischalen wurden von Greiner (Frickhausen) bezogen, Kunststoffröhrchen mit Schraubdeckel (sogenannte „Falcons“) von Falcon (Heidelberg). Standardlaborgeräte stammten von Labotec (Wiesbaden). Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationen in einer kühlbaren Mikroliter-Tischzentrifuge (Centrifuge 5417 R; Eppendorf, Hamburg) oder bei größeren Volumina in einer Tischzentrifuge (Heraeus, Fulda) durchgeführt. Falcons wurden in einer kühlbaren Megafuge 1.0 R (Heraeus, Fulda) zentrifugiert. Zudem wurde eine Sorvall Kühlzentrifuge (RC5B) mit unterschiedlichen Rotoren benutzt. Zur Auswertung von Agarosegelen wurden UV-Transilluminatoren der Wellenlängen 366 nm und 254 nm von Bachofer (Reutlingen) verwendet. Als Photometer diente das ‚BioPhotometer‘ der Firma Eppendorf (Hamburg). Der für Gewebepreparation eingesetzte Ultra-Turax wurde von der Firma Jahnke und Kunkel (Staufen im Breisgau) bezogen. Darüber hinaus verwendete Chemikalien und Geräte werden an gegebener Stelle im Text erwähnt.

3. *Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen*

Für alle molekular- und mikrobiologischen Arbeiten wurden autoklavierte (1 bar Überdruck, 120 °C, 30 min) Geräte verwendet. Ebenso wurde autoklaviertes, entmineralisiertes Wasser benutzt, mit dem auch alle Lösungen angesetzt wurden. Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden für alle Arbeiten mit RNA bidestilliertes, mit DEPC (**D**iethyl-**p**yrocarbonat) behandeltes H₂O sowie gestopfte Pipettenspitzen und Latex-Handschuhe verwendet. Zum verbesserten Schutz vor Ethidiumbromid wurden im Umgang mit den entsprechenden Gelen Handschuhe aus Nitril benutzt.

4. Allgemeine mikrobiologische Methoden

4.1 Nährmedien und Agarplatten

| | |
|--------------------------------|---|
| LB-Medium (pro Liter) | 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 10 g Tryptone pH 7,0 |
| LB-Agar (pro Liter) | 20 g Agar-Agar ad 1L LB-Medium |
| NZY-Medium (pro Liter) | 5 g NaCl 2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 5 g Hefeextrakt 10 g NZ-Amine (Caseinhydrolysat) pH 7,5 |
| NZY-Agar (pro Liter) | 15 g Agar-Agar ad 1L NZY-Medium |
| NZY-Topagar (pro Liter) | 7 g Agarose 1L 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 5 ml 2% (w/v) Gelatine |

Unmittelbar nach der Herstellung wurden alle Medien autoklaviert (1 bar Überdruck, 120 °C, 30 min). Zum Gießen von Agarplatten wurden die Agar-Medien-Lösungen auf 55 °C abgekühlt, bevor die Petrischalen damit etwa zur Hälfte gefüllt wurden. Der Durchmesser der kleinen Platten betrug 85 mm und der der großen Platten 145 mm.

Um ein selektives Wachstum bestimmter resistenter Bakterienstämme oder Transformanten zu begünstigen, wurden die (Agar-)Medien mit Antibiotika versetzt. Da diese Wachstumsinhibitoren temperatursensitiv sind, wurden diese nach dem Autoklavieren zu den auf etwa 55 °C abgekühlte Medien gegeben. Folgende Endkonzentrationen der Antibiotika wurden verwendet:

| | |
|-------------|------------|
| Tetracyclin | 50 µg/ml |
| Ampicillin | 100 µg/ml |
| Kanamycin | 12,5 µg/ml |

Für die Blau-Weiss-Selektion wurde der 1 Liter LB-Agar mit 0,5 mM IPTG (Isopropyl- β -D-Galactosid) und 80 μ g/ml X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid) versetzt, anschließend autoklaviert und mit einem entsprechenden Antibiotikum in Petrischalen gefüllt. Die gefüllten Petrischalen wurden bei 4 °C im Kühlraum und die Nährmedien bei Raumtemperatur dunkel gelagert.

4.2 Bakterienstämme, Phagen und Vektoren

Bakterienstämme

E. coli XL1-blue MRF' (Stratagene, Heidelberg)

E. coli XL0LR (Stratagene, Heidelberg)

Phagen

λ -Phage (Stratagene, Heidelberg)

Ex AssistTM Helper Phage (Stratagene, Heidelberg)

Vektoren

ZAP *Express*TM II Vektor (Stratagene, Heidelberg)

pGEM-TTM (Promega, Mannheim): 3kb; Ampicillin-Resistenz; *multiple cloning site*; lacZ α -Gen

pGEM-T EasyTM (Promega, Mannheim): siehe pGEM-T

TOPO TATM (InvitrogenTM; Groningen, NL): pCRTM4-TOPO 4 kb; Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; *multiple cloning site*; lacZ α -Gen

TOPO XLTM (InvitrogenTM; Groningen, NL): pCRTM-XL-TOPO 3,5 kb; Kanamycin- und Zeocin-Resistenz; *multiple cloning site*; lacZ α -Gen

4.3 Bakterienkulturen

- ***Glycerinkultur***

Um Bakterien dauerhaft aufzubewahren, wurden diese bei -80 °C in der Gefriertruhe gelagert. Dazu wurden $500\text{ }\mu\text{l}$ einer Übernachtskultur mit dem gleichen Volumen an 10 %iger Glycerinlösung versetzt und die Probe anschließend eingefroren.

- ***Plattenkultur***

Die Bakterien einer Glycerinkultur wurden mit einer ausgeglühten Platinöse auf einer Agarplatte ausgestrichen, die zuvor mit dem geeigneten Antibiotikum versetzt wurde. Diese wurde anschließend bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Die mit Parafilm luftdicht verpackte Platte wurde danach bei 4 °C gelagert und war für mehrere Wochen verwendbar.

- ***Flüssig- / Übernachtskultur***

Um eine Flüssigkultur herzustellen, wurden eine Bakterienkolonie von einer Plattenkultur mit einer sterilen Impföse oder Pipettenspitze gepickt und diese in $3 - 50\text{ ml}$ des geeigneten Kulturmediums gegeben. Anschließend wurde der Ansatz bei 37 °C über Nacht bei 220 Upm geschüttelt.

Die Zugabe von Antibiotikum hing von dem jeweiligen Verwendungszweck ab und wird in den einzelnen Abschnitten entsprechend aufgeführt.

- ***MgSO₄-Kultur von Bakterienstämmen***

Von einer Platten- bzw. einer Glycerinkultur wurde eine Bakterienkolonie gepickt und in ein Nährmedium aus 30 ml LB-Medium, $0,2\%$ (w/v) Maltose, 10 mM MgSO₄ und Tetracyclin ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$) übertragen. Die Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (200 Upm) wachsen gelassen, bis ein Extinktionswert größer eins (bei 600 nm) gemessen wurde. Anschließend wurde die Kultur 10 min bei 2400 rpm ($\sim 1000 \times g$) und 4 °C in der Heraeus-Zentrifuge pelletiert. Das Bakterienpellet wurde mit einem halben Volumen der Ausgangsmenge in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) in einem Spektrophotometer (Ultraspec[®] Plus; Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Als Referenz wurde bakterienfreies MgSO₄ verwendet. Ein OD₆₀₀-Wert von 1 entsprach dabei $\sim 8 \times 10^8$ *E. coli*-Bakterien. Die Suspensionen wurden bei 4 °C gelagert.

- **Kompetente Bakterien**

Die Herstellung der kompetenten Bakterien erfolgte nach der CaCl_2 -Methode (Cohen et al., 1972). Der erste Schritt bestand im Ansetzen einer Übernachtskultur, wozu eine Kolonie des *Escherichia coli*-Bakterienstammes XL1-blue von einer vorhandenen Masterplatte gepickt wurde. Die Zugabe des Antibiotikums Tetracyclin verhinderte das Wachsen unerwünschter Bakterien, die im Gegensatz zu XL1-blue keine Tetracyclinresistenz besaßen. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C in den Schüttler gestellt. Am nächsten Tag wurde ein Aliquot der Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 in LB-Medium aufgenommen und so lange bei 37 °C geschüttelt, bis sich ein OD-Wert von etwa 0,2 bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch einstellte. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Bakterien in einer logarithmischen Wachstumsphase, in der man sie gut aufnahmefähig machen konnte. Anschließend wurden die Bakterien bei 3500 rpm für 5 min zentrifugiert (Sorvall[®] RC-5B; Du Pont Instruments, Bad Homburg) und das Pellet in 20 ml eiskaltem 0,1 M MgCl_2 resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Bakterien in 0,1 M CaCl_2 aufgenommen und für mindestens eine halbe Stunde auf Eis quellen gelassen. Dabei quollen die Bakterien durch Destabilisierung der Membran auf, so dass ein gewisser Prozentsatz das gewünscht Plasmide aufnehmen konnte. Die Bakterien waren nun so vorbehandelt, dass sie für die Transformation eingesetzt werden konnten. Bei 4 °C konnten die kompetenten Bakterien bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

5. Allgemeine molekularbiologische Methoden

5.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Die Phenol/Chloroform-Extraktion wird verwendet, um Proteine und einzelne Nukleotide aus einer Lösung von Nukleinsäuren und Proteinen zu entfernen.

Dazu wurde zu der zu reinigenden Probe das gleiche Volumen eines 1:1 Phenol/Chloroform-Gemisches gegeben, anschließend durch Vortexen gründlich gemischt und bei 1000 x g für 2 min zentrifugiert. Nach dieser Phasentrennung war eine milchige Interphase zu erkennen, in der sich die Proteine befanden. Die in der wässrigen Phase befindlichen Nukleinsäuren wurden in ein neues Gefäß überführt. Um sicher zu stellen, dass keine Proteine mehr in der Lösung vorhanden waren, wurde der Schritt wiederholt. Das restliche Phenol wurde durch Alkohol-Fällung entfernt.

5.2 Präzipitation von Nukleinsäuren mit Ethanol

Dieses Verfahren dient der Reinigung von Nukleinsäuren in Lösungen. Die Zugabe von Alkohol in Gegenwart hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen (0,1 - 0,5 M) führt zur Präzipitation der Nukleinsäure-Moleküle. Dabei bleiben Salze und Nukleotide in Lösung. Zudem kann diese Methode zur Entfernung von Phenolresten angewendet werden.

Die zu fällende Nukleinsäure-Lösung wurde mit einer 5 M Natriumchlorid-Stammlösung so gemischt, dass diese eine Endkonzentration von 0,2 M besaß. Danach wurden 2 Volumen an 100 %igem Ethanol bzw. ein Volumen an Isopropanol zugegeben. Die Präzipitation erfolgte entweder bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min oder über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurde die Probe bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min bei $20.000 \times g$ abzentrifugiert. Das Pellet wurde vollständig getrocknet und dann in einem geeigneten Puffer (z.B. TE-Puffer) resuspendiert.

5.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgt photometrisch (Bio-Photometer; Eppendorf, Hamburg) und beruht auf der Extinktion der Stickstoff-Basen bei 260 nm.

Jeweils eine Einheit entsprach dabei:

ds DNA 50 $\mu\text{g/ml}$

ss DNA 37 $\mu\text{g/ml}$

ss RNA 40 $\mu\text{g/ml}$

Durch die Ermittlung der Extinktionswerte bei 230 bzw. 280 nm kann man die Verunreinigung der Probe mit Polysacchariden bzw. Proteinen ermitteln. Bei guten RNA-Präparationen liegt das Verhältnis der Extinktionswerte von 260/230 nm bzw. 260/280 nm bei 1,8 - 2,0.

Für eine schnelle Abschätzung der DNA-Konzentration konnte ein Dot-Test durchgeführt werden. Dazu wurde in eine Petrischale eine 1 %ige Agaroselösung gegeben. Jeweils 1 μl einer Reihe von DNA-Lösungen bekannter Konzentrationen und 1 μl der zu bestimmenden Probe wurden auf das Gel getropft. Nach 10minütiger Inkubation wurde das Gel unter UV-Durchlicht betrachtet und die DNA-Menge im Vergleich zur Eichreihe abgeschätzt.

5.4 Plasmidisolierung

Zur Isolierung des Plasmids aus der Bakterienzelle wurde das E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (peqlab, Erlangen) verwendet und nach dessen Arbeitsanleitung verfahren. Dieses Kit

beruht auf der alkalischen Lyse (Birboim & Doly, 1979) und der reversiblen Bindung von DNA an die Silikamembran eines Zentrifugensäulchens.

Von der Übernachtskultur wurden 1,5 µl entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt. Die Bakterien wurden dann 2 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und das Pellet durch Zugabe zweier Lösungen lysiert. Anschließend wurde das Lysat mit einer dritten Lösung neutralisiert und der bakterielle Niederschlag für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein Zentrifugensäulchen gegeben, an dessen Silikamembran die Plasmid-DNA reversibel gebunden wurde. Durch Waschen der Säule wurden Proteinkontaminationen entfernt. Nach einem Zentrifugationsschritt zum Trocknen der Säule wurde die Plasmid-DNA in 50 µl Wasser eluiert. Die DNA-Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt.

5.5 Restriktionsverdau

Um zu überprüfen, ob das Insert in das Plasmid ligiert wurde, wird der Vektor auf beiden Seiten der Insertionsstelle geschnitten. Als Werkzeug dienen dazu Restriktionsenzyme des Typs II, die den Doppelstrang innerhalb einer für sie spezifischen Sequenzabfolge spalten. Bei dieser Erkennungssequenz handelt es sich meist um ein Palindrom aus vier bis sechs Nukleotiden. Die zu verwendenden Restriktionsenzyme richten sich jeweils nach den multiplen Restriktionsstellen des Vektors.

Der Großteil der verwendeten Restriktionsenzyme wurde von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sowohl der Vektor pCR®4-TOPO als auch der Vektor pCR®-XL-TOPO konnten einem Einfachverdau mit *EcoR* I unterzogen werden. Für den Verdau wurde folgender 10 µl Standard-Restriktionsansatz pipettiert:

2 µl Plasmid-DNA (~ 400 ng)
0,5 µl Restriktionsenzym (2-10 U)
0,5 - 2 µl 10 x Universal-Puffer (gemäß der Herstellerangabe)
auffüllen mit bidest. H₂O auf 10 µl

Die Plasmid-DNA wurde für mindestens zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C verdaut. Die Auswertung des Verdaus erfolgte im Anschluss durch Gelelektrophorese.

5.6 Gelelektrophorese

- *DNA-Gelelektrophorese*

Benötigte Lösungen:

| | |
|-----------------------------------|---|
| 10 × TBE-Puffer | 0,9 M Tris/Cl 0,9 M Borsäure 20 mM EDTA |
| 10 × Probenpuffer | 10 % Glycerin 0,4 % Bromphenolblau |
| Ethidiumbromid-Stammlösung | 10 mg/ml |

Bei diesem Verfahren können Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dabei macht man sich zu Nutze, dass die DNA aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ein negativ geladenes Molekül ist und im elektrischen Feld zur Anode wandert.

Zur Auftrennung wird eine Gelmatrix aus Agarose verwendet, die wie ein Molekularsieb wirkt. Aufgrund ihrer Porenstruktur werden große Moleküle in ihrer Wanderung zurückgehalten, während niedermolekulare Substanzen ungehindert die Matrix passieren können. Die Größe der Poren hängt von der Konzentration der Agarose ab und diese wird je nach gewünschtem Auftrennungsbereich bestimmt. **Tab. 1** liefert Anhaltswerte für die Korrelation von Agarose-Konzentration und Auftrennung der Fragmente:

| Konzentration in % | Trennbereich in kb |
|--------------------|--------------------|
| 0,3 | 5 – 60 |
| 0,6 | 1 – 20 |
| 0,7 | 0,8 – 10 |
| 0,9 | 0,5 – 7 |
| 1,2 | 0,4 – 6 |
| 1,5 | 0,2 – 4 |
| 2,0 | 0,1 – 3 |

Tab. 1: Trenneigenschaft von Agarosegelen

Um die Fragmente im Gel sichtbar zu machen, wird das Agarosegel mit Ethidiumbromid versetzt. Dieses Molekül interkaliert zwischen einzelnen Basenpaaren eines DNA-Doppelstranges, so dass die DNA unter Bestrahlung mit UV-Licht von 254 nm Wellenlänge violett fluoresziert. Das Ergebnis der Auftrennung wird in Form von Banden im Gel sichtbar.

Man sollte allerdings darauf achten, die DNA nicht zu lange dieser kurzen Wellenlänge auszusetzen, da sie sonst geschädigt werden kann.

Um die Größe der aufgetrennten Banden zuordnen zu können, trägt man zusätzlich zu den Proben einen Marker auf (**Abb. 10**). Der verwendete Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker enthält Lambda-Phagen-DNA von bekannter Sequenz, die mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* so geschnitten wurde, dass genau definierte Fragmente entstehen. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde nach gleichem Prinzip hergestellt, indem Plasmide mit geeigneten Endonukleasen verdaut wurden. Durch Vergleich der Laufweiten der Banden von Marker und Probe, kann man Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der Fragmente treffen. Zur Herstellung des Gels wurde eine bestimmte Menge an Agarose, die von der jeweiligen Prozentigkeit des gewünschten Gels abhing, abgewogen und in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 % Ethidiumbromid. Nach kurzem Abkühlen wurde die Flüssigkeit in einen mit Probenkämmen versehenen horizontalen Gelschlitten ausgegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde der Schlitten in eine Gelkammer gelegt und diese mit 1 x TBE-Puffer bedeckt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt. Nun wurden die Probenkämme aus dem Gel gezogen, um den Marker und die Proben in die Taschen des Gels füllen zu können. Die Kammer wurde dann an das Elektrophorese-Gerät angeschlossen und bei konstanter Spannung von 10 V/cm² laufen gelassen. Die Gelelektrophorese wurde gestoppt, als der Farbstoff Bromphenolblau die untere Grenze des Gels erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel aus dem Schlitten genommen und unter UV-Licht auf einem Transilluminator (UV-Transilluminatoren der Wellenlängen 366 und 254 nm, Fa. Bachofer, Reutlingen) ausgewertet. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem „*Video-Copy-Processor*“ (Mitsubishi) fotografiert.

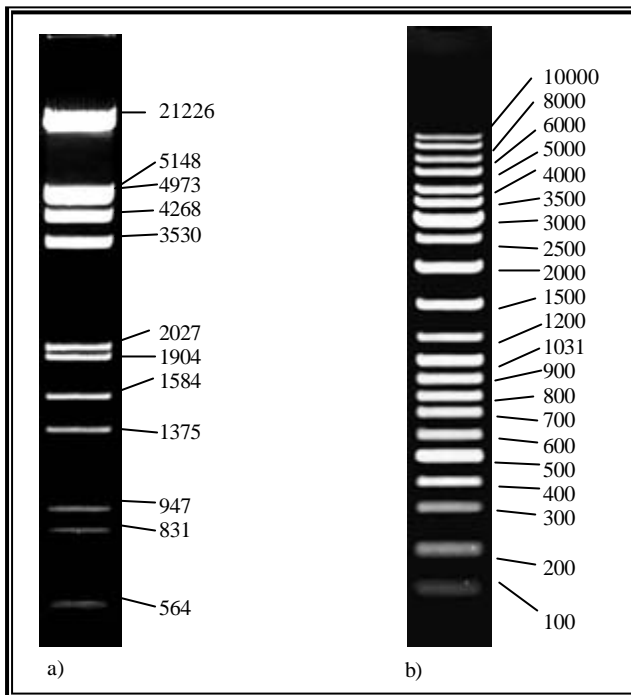


Abb. 10: In dieser Arbeit verwendete Marker.

a) Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker

b) *GeneRuler™* DNA Ladder

Die Gelelektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1,0 % Agarose

0,5 µg/Spur,

8 cm Gellänge,

1 x TAE, 17 V/cm

- **Elektrophoretische Auftrennung von RNA im Agarosegel**

RNA kann als einzelsträngige Nukleinsäure sehr leicht Sekundärstrukturen ausbilden, die den Lauf im Gel verändern. Um dies zu vermeiden, war sowohl im Probenpuffer als auch im Gel selbst Formaldehyd enthalten. Zudem wurde der Probenansatz für 5 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf Eiswasser abgekühlt. Um die RNA sichtbar zu machen, wurde dem Probenpuffer Ethidiumbromid zugesetzt.

Verwendete Lösungen:

10 x Elektrophorese-Puffer (MOPS)

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

Laufpuffer

1 x MOPS

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml

Die Elektrophorese erfolgte in der horizontalen Minigelkammer von Biotech Fischer (Reiskirchen). Für das RNA-Gel wurde 0,4 g Agarose in 4 ml 10 x MOPS und 30 ml bidest. H₂O aufgekocht. Nachdem die Lösung auf etwa 50 °C abgekühlt war, wurden 6,8 ml 37 %ige Formaldehyd-Lösung zugesetzt und die fertige Gellösung in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Nachdem die Agarose sich verfestigt hatte, wurden die Abdichtungen und der Probenkamm entfernt, der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer gesetzt und soviel Elektrophoresepuffer eingefüllt, bis das Gel bedeckt war. Die denaturierten und mit Beladungspuffer versetzten Proben wurden aufgetragen und mit einer konstanten Spannung von 110 V aufgetrennt. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel im UV-Licht betrachtet und mit einem „*Video-Copy-Processor*“ (Mitsubishi) dokumentiert.

- ***Extraktion der DNA aus Agarosegelen***

Um die DNA-Banden aus dem Gel aufzureinigen, bedient man sich der Methode der Gelextraktion. Dazu wurden die Lösungen von dem *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen (Hilden) und die Säulchen von dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit von peqlab verwendet.

Die zu isolierenden Banden wurden unter UV-Licht aus dem Gel mittels eines sterilen Skalpell herausgeschnitten. Anschließend wurde die Agarose bei 50 °C in einem Puffer verflüssigt und die Probe über ein Säulchen gegeben, an dessen Silikamembran die DNA selektiv gebunden wurde. Voraussetzung für diese Bindung ist eine hohe Salzkonzentration und ein pH-Wert unter 7,5, was durch den Puffer gewährleistet wird. Zur Entfernung von Verunreinigungen erfolgte ein Waschschriff. Um Ethanolreste des Waschpuffers zu entfernen, wurde die Säule trocken zentrifugiert. Als letztes wurde die DNA in Wasser eluiert, da sich unter diesen Bedingungen - niedrige Salzkonzentration und leicht alkalischer pH-Wert - die DNA wieder von der Membran löst. Die DNA-Konzentration wurde im Anschluss im Photometer bei 280 nm bestimmt.

5.7 Präparation von Gesamt-RNA

Ein wichtiger Punkt bei der RNA-Isolation ist eine saubere und schnelle Arbeitsweise, um den Abbau der RNA durch RNasen zu vermeiden. Daher ist Folgendes zu beachten:

- das Tragen von Handschuhen
- die Verwendung von gestopften Spitzen
- das Arbeiten auf Eis

→ die Vorbereitung aller für die Isolation notwendigen Lösungen und Materialien

- **Mittels Säulenaufreinigung**

Die Isolation mittels Säulchen erfolgte unter Verwendung zweier verschiedener Kits von peqlab: Zum einen mit dem *E.Z.N.A. Invertebrate RNA Kit*, zum anderen mit dem *E.Z.N.A. Total RNA Kit*. Beide Kits basieren auf der reversiblen Bindung von RNA an die Silikamembran eines Zentrifugensäulchens. Der Unterschied zwischen den beiden besteht darin, dass das RNA Kit für Invertebraten die Entfernung von Mucopolysacchariden einschließt, die bei den meisten Invertebraten in großen Mengen vorliegen. Dazu erfolgt eine Extraktion mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und Chloroform.

Diese Methode der RNA-Isolierung wurde nur bei *Nucula nucleus* angewendet und hierzu jeweils ein Tier eingesetzt. Zuerst wurde dessen Schale entfernt und das Gewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren, um die mechanische Homogenisierung mittels Mörser und Pistill zu erleichtern. Danach wurde das nun pulverisierte Gewebe unter denaturierenden Bedingungen lysiert und die Polysaccharide wurden abgetrennt. Darauf folgte die Bindung der RNA an die Silikamembran eines Zentrifugensäulchens. Die anschließenden Waschschrte entfernten störende Proteine und Kontaminationen. Im letzten Schritt wurde die RNA mit DEPC-dH₂O eluiert, wobei die Ausbeute durch mehrfache Wiederholung der Elution erhöht wurde.

Zur Quantifizierung wurde eine photometrische Bestimmung bei 260 nm mit einem verdünnten Aliquot des Eluats durchgeführt. Anhand der Absorption ließ sich die Konzentration der RNA-Lösung wie folgt berechnen:

$$\text{Konzentration der RNA-Lösung } (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorption}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge absorbierten die aromatischen Aminosäuren, so dass sich daraus die Konzentration an Protein ermitteln ließ. Aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm konnten Rückschlüsse auf die Reinheit der RNA-Lösung gezogen werden. Dabei sollten die Werte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Die RNA-Lösungen wurden bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Für die weiteren Isolationen wurde das *E.Z.N.A. Total RNA Kit* verwendet, da mit beiden Kits die gleiche Ausbeute erzielt wurde, aber das *Total RNA Kit* schneller und leichter zu handhaben war.

- **Mittels GTC-Methode**

Verwendete Lösungen:

| | |
|--|--|
| GTC-Puffer (500 ml) | 4 M Guanidinthiocyanat 25 mM Na-Citrat 20 mM DTT (Dithiothreitol) pH 7,0, mit 1 M NaOH eingestellt sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert |
| CIA | Chloroform / Isoamylalkohol (49:1) |
| 2 M Na Acetat pH 4,0 | |
| Saures Phenol (wassergesättigt) | |
| 8 M LiCl | |

Diese Methode erfolgt unter Verwendung von Guanidinisothiocyanat (Chomczynski & Sacchi, 1987). Dies ist ein chaotropes Salz, das sehr effektiv Proteine denaturiert und somit auch RNasen inaktiviert. Danach wird eine Phasentrennung mittels Phenol durchgeführt, bei der die Proteine entfernt werden.

Die bei -80 °C eingefrorenen Gewebe wurden in GTC-Puffer aufgetaut und homogenisiert, wobei pro g Gewebe 10 - 20 ml des Puffers zugefügt wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml 2 M Natriumacetat pro 10 ml GTC-Puffer und jeweils 0,5 ml Phenol und 0,5 ml CIA pro ml GTC-Puffer. Nach gründlichem Mischen wurde die Suspension auf Eis 15 min gekühlt und dann bei 6000 rpm für 50 min bei 4 °C zentrifugiert. 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 h. Im Anschluss wurde erneut bei 6000 rpm für 50 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml GTC-Puffer gelöst. Dies wurde ein weiteres Mal mit einem Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und 30 min bei -20 °C präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 6000 rpm für 50 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur solange getrocknet, bis der Alkoholgeruch verschwunden war. Danach wurde das Pellet in DEPC-dH₂O gelöst und nochmals bei 6000 rpm für 50 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach diesem Schritt sollte sich die RNA im Überstand befinden.

Zur Aufreinigung der RNA und Entfernung der DNA wurde der abgenommene Überstand mit einem Volumen 8 M LiCl versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Am folgenden Tag wurde bei 6000 rpm für 50 min bei 4 °C zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes wurde das

Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, bis sich der Alkohol vollständig verflüchtigt hatte. Danach wurde das Pellet in DEPC-dH₂O aufgenommen und dann Menge und Reinheit der RNA bestimmt.

Die extrahierte RNA wurde sofort für weitere Versuche eingesetzt oder zur Aufbewahrung mit 0,1 Volumen Na Acetat und 2 - 3 Volumen Ethanol gefällt.

- ***mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA***

Um aus einer Gesamt-RNA-Lösung mRNA zu isolieren, wurde das „*PolyATtract mRNA Isolation System I und IV*“ von Promega (Mannheim) verwendet. Hierbei hybridisiert ein mit Biotin markierter oligo(dT)-Primer spezifisch mit der 3'-Poly(A⁺)-Region der mRNA. Das Biotin wiederum bindet mit hoher Affinität an Streptavidin, welches mit einem paramagnetischen Partikel (PMP) gekoppelt ist. Dieser Komplex wird mittels eines Magnetfeldes festgehalten, während die restliche RNA (und eventuell noch vorhandene DNA) abgewaschen wird. Bei Erniedrigung der Salzkonzentration löst sich die Bindung zwischen dem oligo(dT)-Primer und der Poly-A⁺-RNA. Abschließend wurde die mRNA in mehreren Schritten mit DEPC-dH₂O wieder eluiert.

Die Isolierung wurde ohne Modifikationen laut Herstellerangaben durchgeführt, wobei die gesamte, nach der GTC-Methode gewonnene RNA eingesetzt wurde.

5.8 Präparation von genomischer DNA

Benötigte Lösung:

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

Beim Arbeiten mit DNA ist vor allem darauf zu achten, Scherkräfte zu vermeiden. Das erreicht man durch:

- die Verwendung von weiten Pipettenspitzen
- vorsichtiges Mischen, also nicht vortexen
- eine niedrige Umdrehungszahl auf dem Schüttler

Die Isolation der DNA erfolgte in drei Schritten. Zuerst wurden die Proteine durch das Enzym Pronase zu Aminosäuren abgebaut und anschließend entfernt. Als nächstes wurde durch

Zugabe des Enzyms RNase die vorhandene RNA verdaut. Die DNA erhielt man schließlich durch Präzipitation mit 100 %igem Ethanol, wobei sie als weißer „hairball“ ausfiel.

Für die Präparation wurde das DNA Extraction Kit von Stratagene verwendet. Für die Extraktion wurde im Fall von *Nucula nucleus* ein Organismus eingesetzt, von dem die Schale entfernt wurde. Bei *Nautilus pompilius* wurde etwa 1 g Gewebe eingesetzt. Das Gewebe wurde auf Eis mit einem Skalpell grob zerkleinert und anschließend nach Protokollanleitung weiterbehandelt. Fiel die DNA nicht als „hairball“ aus, wurde die Lösung bei niedriger Umdrehung abzentrifugiert, das Pellet getrocknet und dann in TE-Puffer resuspendiert.

5.9 PCR-Techniken

• *Verwendete Primer*

Die verwendeten Primer, die von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Sigma-Ark (Deisenhofen) bezogen wurden, sind im Anhang aufgeführt. Bei der Auswahl der spezifischen Primer sollten folgende Regeln beachtet werden:

- eine Länge von 17 - 28 Basen
- einen (G+C)-Gehalt von 40 - 60 %
- zueinander passende Annealing-Temperaturen von *upstream*- und *downstream*-Primer
- keine Selbst-Komplementarität
- keine Palindrome
- Ausschluss der Bildung von Primer-Dimeren

Die Eigenschaften des ausgewählten Primers konnten mit Hilfe des Computerprogrammes Oligo Calculator version 3.07 überprüft werden.

Zudem wurden degenerierte Primer verwendet. Bei diesen handelt es sich um ein Gemisch von Oligonukleotiden, die sich einer oder mehreren Positionen unterscheiden.

• *Polymerase-Kettenreaktion (PCR) allgemein*

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*) wird dazu genutzt, um einen genau definierten Teil eines DNA-Stranges zu vervielfältigen (**Abb. 11**). Hierbei wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 94 °C denaturiert, d.h. in seine beiden komplementären Einzelstränge zerlegt. Während des Annealings lagern sich Oligonukleotide, so genannte Primer, an, wobei einer am ‚sense‘-Strang und der andere am ‚antisense‘-Strang

bindet. Damit legen sie den zu amplifizierenden Bereich fest und liefern mit ihrem freien 3'-OH-Ende den Startpunkt für die thermostabile DNA-Polymerase. Dieses Enzym kann daraufhin den jeweiligen DNA-Strang in 5'-3'-Richtung durch Einbau von Desoxyribonukleotiden neu synthetisieren, was als Elongation bezeichnet wird.

Diese drei Schritte - Denaturierung, Annealing und Elongation - werden mehrfach wiederholt, so dass nach jedem Reaktionszyklus die Anzahl der gebildeten DNA-Moleküle verdoppelt wird und eine millionenfache Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts zur Folge hat.

Nach dem letzten Zyklus wurde ein weiterer, verlängerter Elongationsschritt durchgeführt, der zum Auffüllen nicht vollständiger Fragmente sowie zum Anhängen eines Desoxyadenosin an das 3'-Ende der entstehenden DNA-Fragmente dient. Diese Tatsache wird bei der Klonierung ausgenutzt (siehe Kapitel 5.10).

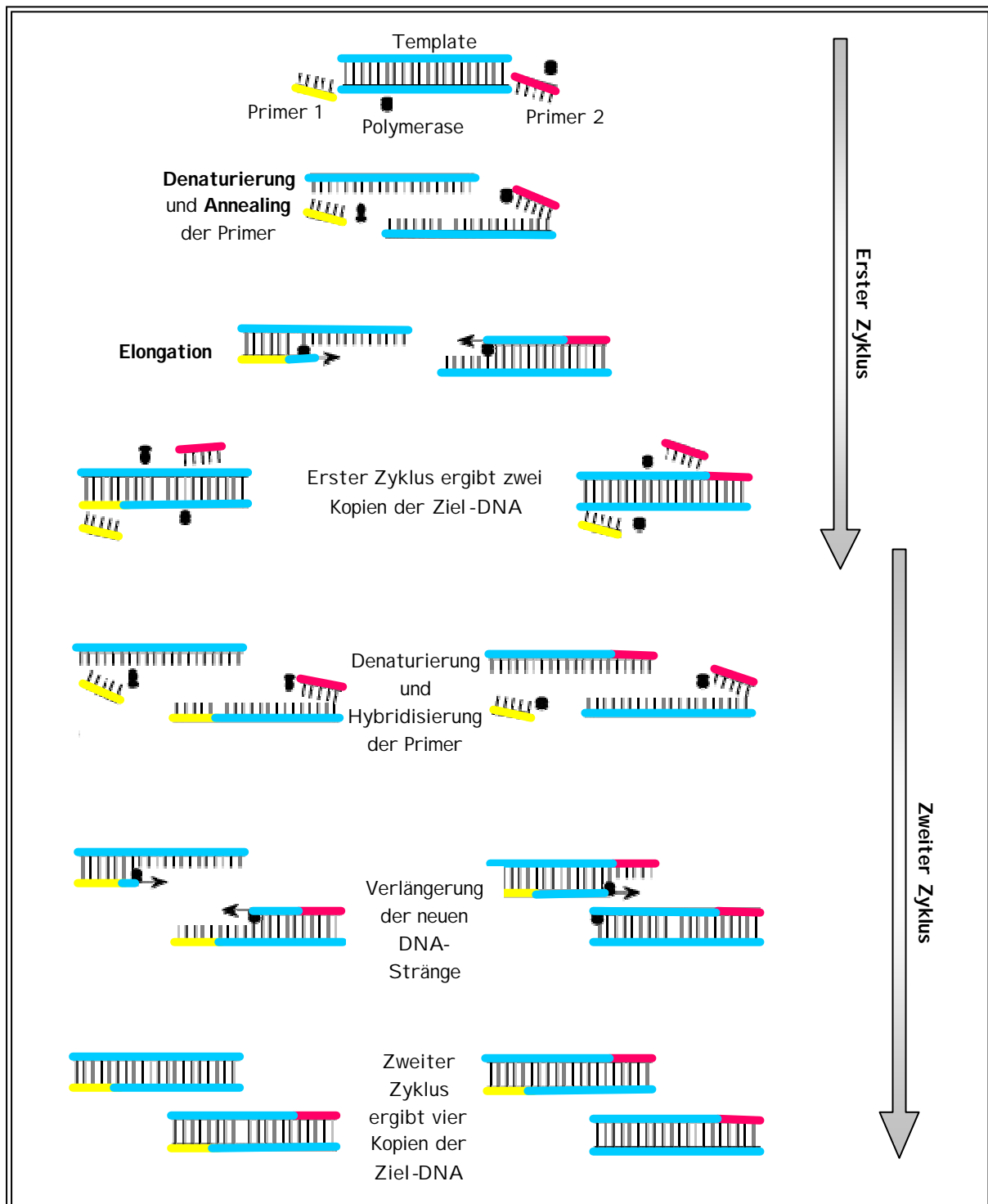


Abb. 11: Schematische Darstellung der ersten beiden Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Die PCR ist in drei sich wiederholende Schritte gegliedert. Zuerst erfolgt die Denaturierung des Templates bei 94 °C, wobei es in die beiden Einzelstränge zerlegt wird. Im darauf folgenden Schritt, der als Annealing bezeichnet wird, binden Primer an die auf dem Einzelstrang komplementäre Sequenz. Anschließend werden, von den Primern ausgehend, die beiden Einzelstränge durch die Taq-Polymerase verlängert (Elongation). Danach beginnt der Zyklus von neuem.

Dass alle Reaktionsschritte in einem Gefäß ablaufen können, wird durch die Thermostabilität der DNA-Polymerase ermöglicht. Diese stammt aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase) und hat ihr Temperaturoptimum zwischen 68 °C und 72 °C.

Als Enzyme wurden die folgenden Taq-Polymerasen entsprechend des Verwendungszwecks eingesetzt:

Taq-Polymerase (InvitrogenTM, Karlsruhe): für alltäglichen Gebrauch zur Amplifikation einfacher Fragmente

Expand DNA-Polymerase-Mix (Roche, Ingelheim): besteht aus einer Mischung von Taq-Polymerase und Pwo-Polymerase, ist besonders zur Synthese von sehr langen Fragmenten (> 3 kb) geeignet

Hot Master Taq (Eppendorf, Hamburg): für schwierigere Templates oder zur Amplifikation spezifischer Fragmente

Red Taq Mix (Sigma, Deisenhofen): besteht aus einem Mix von Puffer, dNTPs, MgCl₂, Taq-Polymerase, mit rotem Farbstoff für Gelelektrophorese versetzt, zur Überprüfung der Klonierungsreaktionen

Die jeweiligen PCR-Ansätze wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers zusammenpipettiert, welches folgende grundlegende Komponenten beinhaltet:

- Die DNA-Matrize, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält
- Zwei Primer, um Anfang und Ende des zu vervielfältigenden Abschnitts festzulegen
- DNA-Polymerase, um den festgelegten Abschnitt zu kopieren
- Nukleotide, die Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang
- Puffer, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellen.

Diese sind entweder bereits mit einer bestimmten Konzentration MgCl₂ versetzt oder dieses muss gesondert dazu gegeben werden.

Die Konzentration dieser Komponenten in einer genomischen PCR entspricht dem folgenden Standardansatz:

0,2 - 1 µg genomische DNA

50 pmol *upstream*-Primer

50 pmol *downstream*-Primer

2 µl dNTP-Mix (10 mM)

10 x PCR-Puffer

1,5 - 8 mM MgCl₂

2,5 Units DNA-Polymerase

Anschließend wurden die Proben gemischt, kurz abzentrifugiert und dann auf Eis gehalten. Am PCR-Gerät (T Gradient Thermocycler 96, Biometra®) wurde ein Programm eingestellt, das je nach gewünschter Fragmentlänge und Annealingtemperatur der Primer variierte.

- **PCR mit RNA**

Neben der „klassischen“ PCR mit DNA als Matrize wurden auch RNA als Ausgangsmaterial herangezogen. Dabei wird die RNA jedoch nicht direkt für die eigentliche PCR-Reaktion eingesetzt, sondern wird zuvor mit Hilfe eines Enzyms, der *Reversen Transkriptase (RT)*, in eine stabilere cDNA umgeschrieben (**Abb. 12**). Entsprechend des Enzyms bezeichnet man diesen Schritt als *Reverse Transkription*. Als Synthesestarter dienen zur RNA revers komplementäre Primer, wobei sowohl Poly-d(T)_n Oligonukleotide als auch sequenzspezifische Primer verwendet wurden. Letztere bieten den Vorteil, dass nur die den Sequenzbereich enthaltene mRNA revers transkribiert wird. Die Zugabe von RNasin verhindert den Abbau von RNA durch eventuell vorhandene RNasen.

Die 5'- und 3'-RACE-PCR stellen eine Variante der RT-PCR dar. Sie ermöglichen durch die Verwendung von so genannten „Anker“-Primern die Amplifikation von cDNA-Strängen, deren 5'-Anfang und 3'-Ende unbekannt ist. Das ‚Generacer‘-System stellt eine Kombination aus 5'- und 3'-RACE-PCR dar.

Reverse Transkription

Zur Durchführung einer RT-PCR gibt es zwei Möglichkeiten. Bei der ersten wird zuerst eine reverse Transkription durchgeführt, aus der in einem darauf folgenden, unabhängigen Reaktionsschritt eine PCR angesetzt wird. Dabei können für die Reverse Transkription und für die PCR unterschiedliche Systeme verwendet werden, die unabhängig voneinander kombiniert werden können. Dagegen wird bei der schnelleren ‚One-Step‘-Methode die PCR unmittelbar mit der reversen Transkription gekoppelt, so dass keine Variationsmöglichkeit besteht.

Folgende Kits wurden für die reverse Transkription verwendet:

One-Step-Methode: - OneStep RT-PCR Kit (Quiagen, Hilden)

Two-Step-Methode: - Expand RT (Roche, Ingelheim)

- SuperScriptTM III-RT (InvitrogenTM, Karlsruhe)

- cMasterTM RT (Eppendorf, Hamburg)

Die Zusammensetzung der Ansätze und der Reaktionsverlauf richteten sich nach dem Protokoll des Herstellers. Pro Ansatz wurde 0,7 - 1µg Gesamt-RNA eingesetzt.

Die reverse Transkription beginnt mit einer Inkubation des Ansatzes bei 70 °C, um mögliche Sekundärstrukturen der RNA zu lösen. Erst im Anschluss wird die reverse Transkriptase zugesetzt, die bei 42 °C innerhalb einer Stunde die einzelsträngige RNA in eine doppelsträngige cDNA umschreibt.

Diese cDNA kann nun direkt zur Amplifikation mittels PCR eingesetzt oder bis zur Verwendung im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt werden.

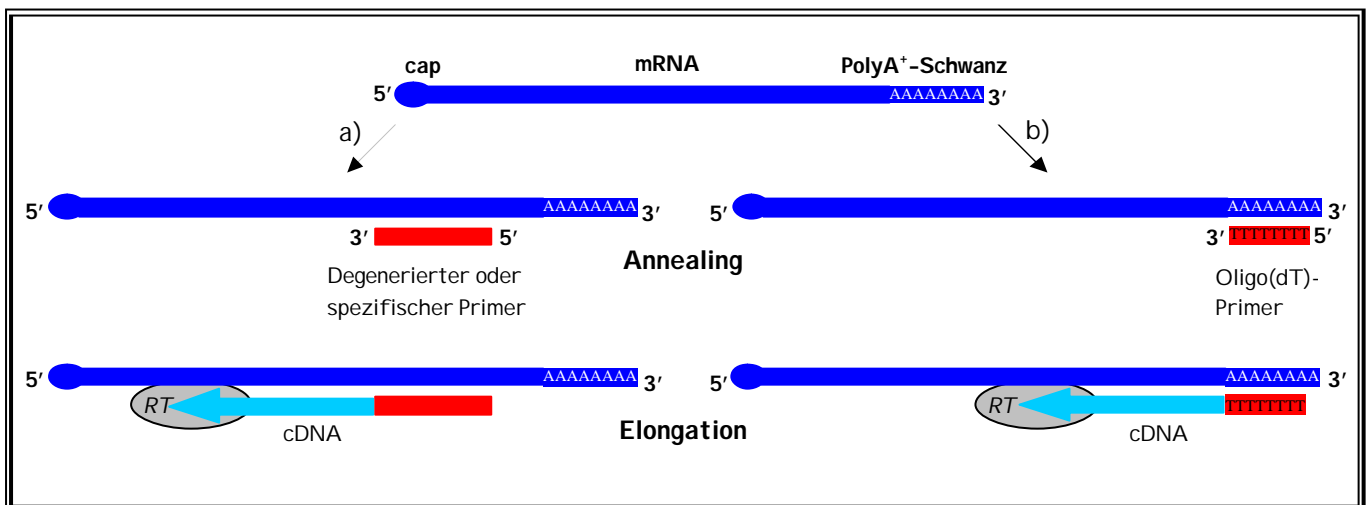


Abb. 12: Schematische Darstellung der reversen Transkription.

Als Matrize dient mRNA, an die während des Annealings entweder ein degenerierter bzw. spezifischer Primer (a) oder ein Oligo(dT)-Primer (b) bindet. Dieser dient in beiden Fällen als Startpunkt für die cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase.

5'- Race

Um die Sequenz des 5'-Endes der mRNA zu erhalten, wurde das "5'-RACE-system for Rapid Amplification of cDNA ends" von Invitrogen™ verwendet. Dazu wird zuerst eine Erststrang-Synthese mit einem genspezifischen Primer durchgeführt. Mittels einer terminalen Deoxynukleotidtransferase (TdT) wird anschließend eine Oligo-dC an das 3'-Ende der cDNA angehängt. In der darauf folgenden PCR-Reaktion kann an diesen Adapter ein Oligo-dG-Primer binden, der zusammen mit dem genspezifischen Primer bzw. mit einem genspezifischen *Nested* Primer den zu amplifizierenden Bereich festlegt. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass das Oligo-dC nicht nur an vollständige cDNA angehängt wird, sondern auch an solche, bei der die Elongation ‚abgebrochen‘ ist. Daher empfiehlt es sich, einen genspezifischen Primer auszuwählen, der sehr dicht am 5'-Ende der mRNA liegt. Der

RACE wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei 0,7 - 1 µg Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial diente.

3'- RACE

Mit Hilfe des „3'-RACE-system for Rapid Amplification of cDNA ends“ von Invitrogen™ konnte die Sequenz am 3'-Ende der mRNA vervollständigt werden. Dieses System macht sich den poly(A)-Schwanz der mRNA an ihrem 3'-Ende zu Nutze, indem ein Oligo(dT)-Primer für die reverse Transkription eingesetzt wird. Dieser Primer enthält zusätzlich eine Adapter-Region, an die in der darauf folgenden PCR-Reaktion ein komplementärer Primer binden kann. Als *upstream*-Primer wird ein genspezifischer Primer bzw. *Nested* Primer verwendet. Auch hier wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren, wobei 0,7 - 1µg Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial diente.

GeneRacer

Im Gegensatz zu den beiden oben beschriebenen RACE-Kits, bietet das GeneRacer™ Kit (Invitrogen™, Karlsruhe) den Vorteil, dass gleichzeitig das 5'- und 3'-Ende amplifiziert werden können. Speziell für das 5'-Ende versichert das Kit, dass nur mRNA mit Cap-Struktur in der PCR-Reaktion amplifiziert werden. Das Protokoll des GeneRacers™ beginnt mit einer Dephosphorylierung, um abgebrochene mRNA bzw. Nicht-mRNA in den folgenden Schritten als Reaktionspartner ausschließen zu können. Danach wird von der vollständigen mRNA die Cap-Struktur entfernt, so dass ein 5'-Phosphat übrig bleibt. Dieses wird für die anschließende Ligation mit dem RNA Oligo benötigt, der als eine Andockstelle für den 5'-Primer dient. Als 3'-Primer wird, wie bei dem 3'-RACE, ein Adapter-Sequenzen enthaltener Oligo(dT)-Primer verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

- **Sonden-PCR**

Sonden wurden im Rahmen dieser Arbeit benötigt, um Hämocyanin-Sequenzen gezielt mittels Screenings oder Southern Blots nachzuweisen. Zur Herstellung der Sonde wurden Fragmente verwendet, die bereits durch Sequenzierung als Hämocyanin identifiziert wurden. Die nichtradioaktive Markierung erfolgte über die Polymerase-Ketten-Reaktion unter Verwendung des PCR DIG Labelling Mix (Roche, Ingelheim), in dem zusätzlich zu den vier Desoxynukleotiden ein mit Digoxigenin markiertes Desoxyuridin enthalten ist. Bei

Digoxigenin handelt es sich um ein Cardenolid-Steroid aus dem Fingerhut (**Abb. 13**). Durch Verwendung eines hochaffinen Digoxigenin-spezifischen Antikörpers, der kovalent mit einer Reportergruppe (hier: alkalische Phosphatase) verbunden ist, lässt sich das gesuchte Fragment anhand einer Farbreaktion identifizieren.

Es wurde folgender PCR-Ansatz zusammenpipettiert:

50 - 200 ng der eluierten Bande bzw. des Plasmids
10 pmol *upstream*-Primer
10 pmol *downstream*-Primer
1 µl PCR DIG Labelling Mix
3 µl MgCl₂ (25 mM)
5 µl 10 x Puffer
0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 Units)
mit bidest. H₂O auf 50 µl aufgefüllt

Der gemischte Ansatz wurde kurz abzentrifugiert, anschließend in das PCR-Gerät gestellt und mittels eines Standardprogramms amplifiziert. Danach wurde die Sonde mittels eines Dot Tests auf ihren Digoxigenin-Einbau überprüft. Dazu wurde 1 µl der Sonde auf eine Nylonmembran aufgetropft, anschließend freie Bindungsstellen mit Blockierungslösung abgedeckt und mit dem Digoxigenin-Antikörper inkubiert. Die daran gekoppelte Alkalische Phosphatase setzt nach Zugabe von NBT/BCIP dieses in einen blauen Farbniederschlag um (**Abb. 13**). Anhand der Intensität der Färbung konnte die für die Hybridisierung erforderliche Menge abgeschätzt werden. Die Sonde wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Das detaillierte Detektionsprinzip und die dazu verwendeten Lösungen sind in Kapitel 5.12 beschrieben.

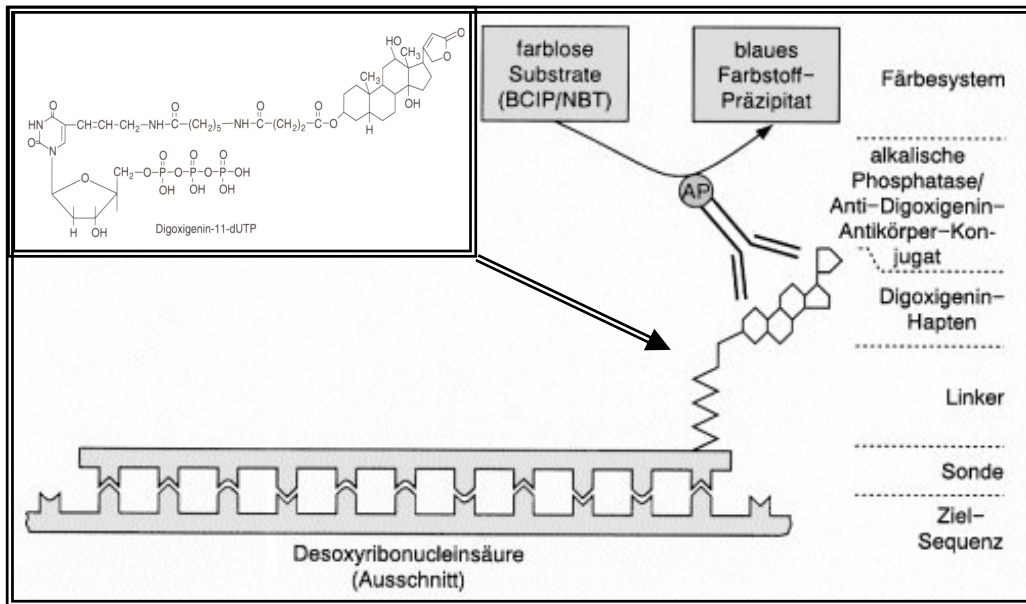


Abb. 13: Detektionsprinzip mit einer Digoxigenin-markierten Sonde.

Die markierte Sonde hybridisiert an den die Zielsequenz enthaltenden Einzelstrang. Das Digoxigenin (kleiner Kasten) der Sonde wird von Anti-Digoxigenin-Antikörper erkannt, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. Das Enzym setzt die farblosen Substrate BCIP/NBT in ein farbiges Präzipitat um.

- **Sequenzierungs-PCR**

Die Sequenzreaktionen wurden in unserem Labor nach der *Cycle-Sequencing*-Methode durchgeführt. Die Sequenzierprodukte wurden durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (*dye terminators*) markiert.

Die Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

x µl PCR-Produkt oder Plasmid
 2 µl *Big Dye* Version 3.1
 2 µl Tacs-Puffer
 1 µl Primer (10 pmol)
 mit bidest. H₂O auf 20 µl aufgefüllt

Die Menge an eingesetztem Template variierte je nach dessen Konzentration, Länge und Art. Für die Sequenzierungsreaktion wurde folgendes Programm verwendet:

94 °C 10 sec
 55 °C 4 min → 30 Zyklen

Anschließend wurden die Proben bei 4 °C aufbewahrt, bis sie zur weiteren Analyse der Firma GENterprise übertragen wurden.

- ***Klon-PCR***

Dabei handelt es sich um ein schnelles Verfahren, um Klone einer Klonierungsplatte auf den Einbau des richtigen Inserts zu überprüfen. Für die PCR-Reaktionen wurde der Red Taq Mix (Sigma, Deisenhofen) und diese folgendermaßen angesetzt:

11,5 µl Red Taq Mix

12,5 µl bidest. H₂O

0,5 µl *upstream*-Primer (10 pmol)

0,5 µl *downstream*-Primer (10 pmol)

Anschließend wurde eine Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte gepickt und diese in den Ansätzen kurz gerührt. Danach wurde die Pipettenspitze in eine Falcon überführt und dort zum späteren Ansetzen einer Flüssigkultur aufbewahrt. Das Programm wurde nach Herstellerangaben eingestellt, wobei die Elongationszeit je nach Größe des eingebauten Inserts variierte.

5.10 Klonierung

Unter diesem Verfahren versteht man den Einbau eines DNA-Abschnitts in einen Klonierungsvektor (Ligation), der anschließend in Wirtszellen vermehrt wird (Transformation). Dies bietet zum einen den Vorteil, dass man eine hohe Kopienzahl des Inserts aufgrund der schnellen Replikationsgeschwindigkeit der Bakterien erhält. Zum anderen ist es dadurch möglich, DNA-Abschnitte in reiner Form zu erhalten, d.h. dass Banden, die im Gel aufgrund der gleichen Größe nicht zu trennen sind, hierbei in verschiedene Vektoren kloniert werden können. Nach der Transformation wird das Plasmid wieder aus der Bakterienzelle isoliert und das Insert mittels Restriktionsenzymen aus dem Vektor herausgeschnitten. Um zu überprüfen, ob die Klonierung funktioniert hat, bedient man sich der Gelelektrophorese, in der man sowohl die Bande des Vektors, als auch die des Inserts sehen sollte. Diese lassen sich anhand des Molekulargewichts der Banden im Gel unterscheiden.

- **Ligation**

Bei dieser Reaktion wurde die isolierte DNA-Bande in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy bzw. pGEM-T (beide Promega, Mannheim) ligiert. Beide Vektoren besitzen an ihrem 3'-Ende einen Thymidin-Überhang. Dieser begünstigt einerseits die Ligation mit dem 3'-Adenosin des PCR-Produkts, andererseits wird der Zirkularisierung des Vektors vorgebeugt. Um der Selbst-Ligation zusätzlich entgegenzuwirken, muss das Insert im molaren Verhältnis zum Vektor in einer wesentlich höheren Konzentration zugesetzt werden (mindestens 1:3). Für die Ligation ist zudem das Enzym Ligase (Roche, Ingelheim) notwendig, das unter ATP-Verbrauch die Verknüpfung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einem freien 3'-Hydroxylende katalysiert.

Für die Ligation wurde folgender Ansatz pipettiert:

0,5 µl Vektor (50 ng/µl)
1µl 10 x Rapid Ligation Puffer
1 µl T4 DNA-Ligase
x µl Insert
mit bidest. H₂O auf 10 µl auffüllen

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen und anschließend transformiert.

- **Transformation**

Bei der Transformation werden die DNA-Moleküle in Form von Plasmiden durch Hitzeschock in die kompetenten Bakterienzellen aufgenommen.

Dazu wurden zu 100 µl der kompetenten Zellen der Ligationsansatz hinzu gegeben und für mindestens 40 min auf Eis gehalten. Danach erfolgte der Hitzeschock, bei dem der Ansatz für 1 min auf 42 °C im Wasserbad erwärmt wurde. Die Probe wurde nun erneut für 2 min auf Eis gestellt und anschließend 500 µl LB-Medium hinzugefügt. Zur Erholung und letztlich auch zur Vermehrung der Bakterien wurde der Ansatz für 1 - 3 h bei 37 °C geschüttelt. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Ansatz für 5 min bei 1000 x g abzentrifugiert und 500 µl von dem Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und der Ansatz auf X-Gal/Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Nachdem die Flüssigkeit vollständig in die Platten eingezogen war, wurde diese über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

- **Blau-Weiß-Selektion**

Am nächsten Morgen konnten die Bakterien nach ihrer Blau/Weiß-Färbung (Langley et al., 1975) selektiert werden. Dieses Phänomen beruht auf folgendem Prinzip:

Der hier verwendete *E. coli*-Stamm trägt ein mutiertes *lacZ*-Gen, das nur für den α Peptidteil der β -Galactosidase codiert. Für die Bildung des Enzyms benötigen die Bakterien zusätzlich den fehlenden Abschnitt. Dieser Teil wird von dem Plasmid geliefert, das in die Bakterien durch die Transformation eingebracht wurde. Die Expression von diesem Abschnitt bleibt aus, wenn das Insert innerhalb des codierenden Bereichs hineinligiert wurde. Somit dient die Galactosidase-Aktivität als ein Indiz, ob ein Insert in dem Plasmid vorhanden ist. Die Aktivität weist man durch eine Reaktion nach, die durch das Enzym katalysiert wird. Als Substrat wird das Lactoseanalogon X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) verwendet, das in Anwesenheit von β -Galactosidase zu einem blauen Produkt umgesetzt wird. Solche Klone, die ein Plasmid ohne Insert tragen, sind also blau gefärbt. Die anderen, bei denen in das Plasmid das Insert hineinligiert wurde, stellen die weißen Kolonien dar.

Die weißen Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte gepickt und einzeln in LB-Medium mit 0,01 % Ampicillin gegeben. Anschließend wurden die Ansätze über Nacht bei 37 °C geschüttelt und am nächsten Tag einer Plasmidisolierung (Kapitel 5.4) unterzogen.

- **TOPO Klonierung**

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine sehr schnelle und effektive Art der Klonierung. Hierbei ist die Zugabe von Ligase nicht notwendig. Stattdessen bedient man sich eines anderen Mechanismus: Eine Topoisomerase I bindet an die doppelsträngige DNA des Vektors und spaltet diese nach der spezifischen Sequenz 5'-CCCTT-3'. Es kommt zur Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Stranges und der Hydroxylgruppe eines Tyrosylrestes der Topoisomerase. Diese Bindung kann durch den Angriff des 5'-OH von dem PCR-Produkt aufgehoben werden, so dass das gewünschte Insert in den Vektor hineinligiert wird. Um die Ligation zu gewährleisten, ist ein überhängendes Desoxyadenosin am PCR-Produkt erforderlich, welches zu dem Thymidin-Überhang des Vektors komplementär ist.

Für die Klonierung wurden zwei verschiedene Kits verwendet: zum einen der TOPO TA Cloning KitTM, zum anderen das TOPO XL PCR Cloning KitTM. Letzteres wurde vor allem für die Klonierung besonders großer Fragmente (> 2 kb) benutzt.

Die Klonierung wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Es wurde jedoch bei jedem Kit nur die Hälfte der angegebenen Menge an Vektor für die Ligation eingesetzt. Die Bakterien waren in dem jeweiligen Kit enthalten, wurden allerdings ebenfalls nur zur Hälfte eingesetzt. Es konnten aber auch die unter Abschnitt 4.3 beschriebenen kompetenten Bakterien verwendet werden.

5.11 Southern Blot

Darunter versteht man eine Methode, bei dem Nukleinsäuremoleküle zuerst im Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden und das Trennmuster anschließend auf eine geeignete Trägermembran übertragen wird. Zur Detektion bestimmter Moleküle auf dem Filter werden spezifische Sonden verwendet.

Benötigte Lösungen:

| | |
|-----------------|----------------|
| 20 x SSC | 3 M NaCl |
| | 0,3 M NaCitrat |

Zudem wurden die gleichen Lösungen verwendet, die in Abschnitt 5.12 aufgeführt sind.

Bevor der Transfer erfolgen konnte, musste zuerst die zu untersuchende Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Anschließend wurden die als Banden vorliegenden DNA-Moleküle im Gel für 30 min in Denaturierungspuffer in Einzelstränge zerlegt, um die spätere Hybridisierung mit der Sonde zu ermöglichen. Danach wurde das Gel für 30 min in Neutralisierungspuffer gelegt. Für den Transfer wurde eine Apparatur entsprechend dem in **Abb. 14** gezeigten Schema aufgebaut.

Aufgrund seiner hohen Salzkonzentration wurde als Puffer 20 x SSC verwendet, weil dadurch der Transfer aus dem Gel auf die Membran erleichtert wurde.

Das Blotting erfolgte über Nacht.

Die Membran wurde nach dem Blotting zuerst getrocknet und anschließend für 30 min bei 80 °C im Trockenschrank gebacken, um die DNA auf der Membran zu immobilisieren. Nach dem Backen wurde die Membran in 2 x SSC zweimal für 5 min äquilibriert.

Der Ablauf der Detektion erfolgt nach den in Kapitel 5.9 für die Sonden-PCR aufgeführten Schritten.

Die Farbreaktion setzte etwa 15 min nach Zugabe der Färbelösung ein. Dabei wurden deutlich Banden sichtbar, die sich anhand des Gelfotos zuordnen ließen.

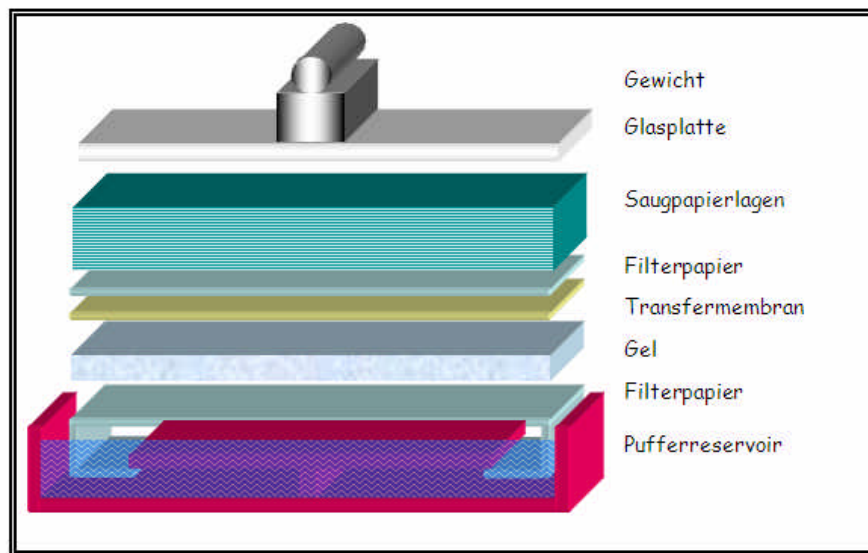


Abb. 14: Aufbau eines Southern Blots.

Das zu blottende Gel wird auf ein Filterpapier (Whatman ® 3MM) gelegt, das zu beiden Seiten in das Pufferreservoir hineinragt. Auf dem Gel wird die Transfermembran aus Nylon deckungsgleich platziert, gefolgt von drei Schichten Filterpapier und einigen Lagen an Saugpapier. Um den Aufbau zu beschweren, wurde eine mit einem Gewicht versehene Glasplatte darauf gelegt. Der Transfer der DNA auf die Membran wird durch den Sog des Transferpuffers (20 x SSC) vom Pufferreservoir bis zu den Saugpapierlagen aufgrund der Kapillarkräfte angetrieben.

5.12 Durchsuchen der genomischen DNA-Bibliothek („Screening“)

Um die genomische DNA-Bank nun gezielt nach Hämocyanin-Sequenzen zu durchsuchen, wurde die so genannte „Plauefilterhybridisierung“ verwendet. Bei dieser Methode wird das Plauemuster im Bakterienrasen auf eine Membran übertragen, auf der anschließend die Detektion erfolgt. Dazu können entweder spezifisch gegen das Hämocyanin gerichtete Antikörper verwendet werden, die die von den Wirtsbakterien exprimierten Proteine erkennen. Eine andere Möglichkeit ist, die gesuchte DNA selbst mit DNA-Sonden nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde nur ein Sonden-Screening durchgeführt, da kein spezifischer Antikörper vorhanden war. Die verwendeten Sonden wurden mit Hilfe von Primern hergestellt, die aus bereits bekannten Hämocyanin-Sequenzen ausgesucht wurden. Die Herstellung dieser Sonden wurde bereits in einem früheren Kapitel (5.9) besprochen.

- **Screening mit DNA-Sonden**

Verwendete Lösungen:

| | |
|--|--|
| 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 ca. 50 °C erwärmen |
| Waschpuffer | 0,15 M NaCl 0,1 M Tris/Cl pH 7,5 |
| Blockierungslösung | Waschpuffer 1 % (w/v) Blockingreagenz |
| AP-Puffer (pro Liter) | 0,10 M Tris 0,10 M NaCl 0,05 M MgCl ₂ pH 9,5 |
| Färbelösung | 66 µl NBT (Nitroblau-Tetrazolium) 33 µl BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat) in 10 ml AP-Puffer |

Für die erste *Screening*-Runde wurden auf großen Agarplatten jeweils 4×10^4 „*plaque forming units*“ (pfu) ausplattiert. Dazu wurden 600 µl einer frischen MgSO₄-Kultur von XL1-Blue MRF' Bakterien, die zuvor auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt worden waren, mit der entsprechenden Menge an Phagensuspension versetzt. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert und danach mit 8 ml auf 48 °C temperierten NZY-Top-Agar auf vorgewärmte große NZY-Platten ausplattiert. Nach dem Erstarren des Top-Agars wurden die Platten umgedreht bei 37 °C über Nacht in den Brutschrank gestellt. Vor dem eigentlichen Transfer der Phagenplaques auf eine Nylonmembran mussten die Platten am nächsten Morgen für mindestens 30 min kühl gestellt werden, um eine Ablösung des Top-Agars beim Abziehen der Filter zu vermeiden. Die beschrifteten Nylonfilter wurden auf die Platten gelegt und mittels einer Nadel in der Weise markiert, dass der Abklatsch der Phagen auf den Filtern später den

Plaques auf den Platten zugeordnet werden konnte. Parallel wurde Whatman 3 MM Filterpapier der passenden Größe auf einer sauberen Arbeitsfläche ausgebreitet und zuerst mit alkalischem Denaturierungspuffer getränkt. Darauf wurden die Filter mit der Plaquesseite nach oben transferiert und für 5 bis 10 min denaturiert. Nach gleichem Verfahren wurden die Filter anschließend für 10 bis 15 min mit Neutralisierungslösung und letztlich für 10 min mit Äquilibrationlösung inkubiert. Nachdem die Filter kurz getrocknet wurden, erfolgte die Immobilisierung der DNA bei 80 °C für 30 min im Trockenschrank. Nach dem Trocknen wurden die Filter für 1 h bei 68 °C in der Hybridisierungslösung prähybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die Sonde in Hybridisierungslösung aufgenommen, wobei 10 ng Sonde pro ml Lösung eingesetzt wurden. Die Sonde wurde anschließend im Wasserbad bei 95 °C für 10 min denaturiert und danach sofort zu den Filtern gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C im Wasserbad unter Schwenken. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgeschüttet und bis zur nächsten Verwendung bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Die Filter wurden zuerst 2 x 5 min in 2 x SSC/0,1 % SDS und anschließend 30 min in 0,5 x SSC/0,1 % SDS bei 68 °C gewaschen. Diese Schritte dienten zur Entfernung von unspezifisch gebundener Sonde. Die Filter wurden dann kurz in Waschpuffer äquilibriert. Danach wurden die noch freien Bindungsstellen für 1 h in Waschpuffer mit 1 % Blockingreagenz abgesättigt. Anschließend wurde das α -DIG AP-Konjugat in einem Verhältnis von 1:7500 in Waschpuffer/1 % Blocking Reagenz gelöst und die Filter für 1 h darin geschwenkt. Bei diesem Schritt reagierte der Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist, spezifisch mit dem Digoxigenin der Sonde. Als nächstes wurde ungebundener Antikörper durch drei 5minütige Waschschrte mit Waschpuffer entfernt. Dann wurden die Filter in AP-Puffer äquilibriert, da die alkalische Phosphatase bei einem pH-Wert von 9,0 optimal arbeitet. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe der Färbelösung herbeigeführt. Dabei wurde BCIP durch die alkalische Phosphatase zu einem violett-braunen Produkt umgesetzt, während NBT als Farbverstärker der Reaktion diente. Die Farbreaktion wurde durch H₂O abgestoppt, sobald eindeutige Signale zu erkennen waren.

Positiv identifizierte Plaques wurden mittels einer abgeschnittenen Pipettenspitze ausgestochen. Dabei machte man sich die übereinstimmende Markierung auf Filter und dazu passender Platte zunutze, um den richtigen Plaque zu identifizieren. Die Plaques wurden zu 400 μ l SM-Medium mit 20 μ l Chloroform gegeben und die Phagen auf dem Schüttler im Kühlraum eluiert.

Die entstandene Phagensuspension wurde in geeigneter Weise verdünnt und erneut zur Infektion von Wirtsbakterien eingesetzt. Im Folgenden wurden die Schritte des

Sondenscreenings so lange wiederholt, bis ein positiver Plaque einzeln ausgestochen und somit eine Verunreinigung durch negative Phagenklone ausgeschlossen werden konnte.

- ***In vivo-Excision***

Bei der Herstellung der cDNA-Bank wurden die verschiedenen cDNA-Fragmente in den ZAP ExpressTM-Vektor (λ -Vektor). Dieser besteht zum einen aus den λ -Armen des Phagen, zum anderen noch aus der Sequenz eines Phagemids (pBK-CMV), welche das Insert flankiert. Das Phagemid wiederum ist auf der einen Seite von der Initiationsstelle, auf der anderen Seite von der Terminationsstelle umgeben. Bei der *in vivo*-Excision macht man sich diesen Aufbau zu Nutze, um das Phagemid zusammen mit dem Insert aus dem λ -Vektor zu extrahieren. Dazu wurden *E. coli* XL1-blue MRF'-Zellen mit dem Helferphagen ExAssistTM (f1 Bakteriophage; Stratagene, Heidelberg) und dem λ -Vektor koinfiziert. Innerhalb des Bakteriums erkennen die f1-Bakteriophagen-Proteine die Initiationsstelle in der DNA des λ -Vektors und verursachen einen Strangbruch im Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Ausgehend von diesem *nick'* beginnt die Synthese von einzelsträngiger (ss)DNA „*downstream*“ bis zur Terminationsstelle. Das Genprodukt II des Helferphagen zirkularisiert den linearen Einzelstrang, wodurch wieder ein f1 „ori“ entsteht. Durch das in der Terminationsstelle enthaltene Verpackungssignal wird das entstandene Phagemid in Phagenhüllen verpackt und sezerniert. Im Anschluss werden die Bakterien abgetötet. Um doppelsträngige DNA zu erhalten, infiziert man *E. coli* XL0LR-Zellen mit den verpackten und sezernierten Phagen. Die Bakteriophagen-Suspension wird dann auf Kanamycin-LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Helferphagen können nicht wachsen, da sie sich in Su⁻-Stämmen wie XL0LR nicht replizieren können.

6. Sequenzanalyse und Phylogenie

Die Sequenzdaten wurden mit den in **Tab. 2** aufgelisteten Computerprogrammen bearbeitet. Die erhaltenen Chromatogramme wurden zuerst mithilfe von CHROMAS editiert und anschließend mit TRANSLATE in die Aminosäuresequenz übersetzt. Um eine Sequenz zu identifizieren, wurde ein Vergleich mit Informationen aus weltweiten Datenbanken durchgeführt (Blast Japan oder Blast NCBI). Die Signalpeptide der Aminosäuresequenzen wurden mit dem Tool "SignalP 3.0" ermittelt (Bendtsen et al., 2004). Stellte sich dabei heraus, dass es sich um eine Hämocyanin-Sequenz handelt, so wurde entweder mit "ClustalX 1.83" ein automatisches und zusätzlich mit "GeneDoc 2.6" ein manuelles "Alignment" erstellt (Nicholas & Nicholas, 1997). Das editierte Alignment konnte für die Erstellung eines Stammbaumes als Grundlage genommen werden, mit Hilfe dessen sich die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse von Organismen darstellen lassen. Die Signalpeptide wurden nicht in die Analysen eingebracht. Zudem wurden die Linkerpeptide und die Sequenzüberhänge in FU-*a* und FU-*g* entfernt. Für die phylogenetischen Berechnungen wurde zum einen das PHYLIP 3.6a2 Package (Felsenstein, 2001) verwendet. Distanzen zwischen Sequenzpaaren wurden mittels der PAM-Matrix berechnet (Dayhoff et al., 1978). Zur Konstruktion der Stammbäume wurde die Neighbor-joining-Methode angewendet. Die Zuverlässigkeit der Bäume wurde mittels Bootstrapping mit 100 *Pseudosamples* überprüft (Felsenstein, 1985). Zudem wurden phylogenetische Analysen mit MRBAYES 3.0 durchgeführt (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Dabei wurde den Berechnungen die Dayhoff-Matrix zugrunde gelegt mit einer Gamma-Verteilung der Raten. *Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo Sampling* wurde mit vier Ketten für 150000 Generationen durchgeführt. Das Sampling der Bäume fand alle 10 Generationen statt. *Posterior probabilities* wurde an 10000 Stammbäumen abgeschätzt (*burnin* = 5000). Molekulare Stammbäume wurden mit "Treeview" dargestellt.

Unter Anwendung von Swiss-Model wurde mit Hilfe der bekannten Kristallstruktur von OdH-*g* (Cuff et al., 1998) ein Homologie-Modell der entsprechenden funktionellen Domäne von *Nautilus pompilius* erstellt.

| | |
|-------------------------------|---|
| Datenanalyse | |
| CHROMAS | http://trishul.sci.gu.edu.au/~conochromas.html |
| TRANSLATE | http://www.expasy.ch/translate |
| SIGNALP 3.0 | http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ |
| Datenbanksuche | |
| Blast Japan | http://www.blast.genome.ap.jp/ |
| Blast NCBI | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ |
| Alignment | |
| ClustalX 1.83 | ftp://ftg-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/ |
| GeneDoc 2.6 | http://www.psc.edu/biomed/genedoc/ |
| Stammbaumerstellung | |
| ClustalX 1.83 | siehe oben |
| PHYLIP 3.6 | http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html |
| MRBAYES 3.0 | http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes/ |
| Stammbaumeditor | |
| Treeview 1.6 | http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html |
| Proteinmodellierung | |
| SWISSMODEL | http://www.expasy.ch/spdbv |
| Primer | |
| Oligo Calculator version 3.07 | http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html |

Tab. 2: Verwendete Computerprogramme.

7. *Allgemeine proteinbiochemische Methoden*

7.1 Entnahme und Aufbereitung der Hämolymphe

| | |
|------------------------------|---|
| Stabilisierungspuffer | 50 mM Tris 5 mM CaCl ₂ 5 mM MgCl ₂ 0,15 M NaCl pH 7,4 |
|------------------------------|---|

Die Organismen, in diesem Fall die Muscheln, wurden auf Eis präpariert. Dazu wurde zuerst die Schale entfernt, das Gewebe mit einer Kanüle angestochen und die Hämolymphe mit einer Pipette abgenommen. Die gesammelte Flüssigkeit wurde anschließend für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, um größere Gewebereste zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend auf Zentrifugenröhrchen (Ultra-Clear Centrifuge Tubes, 8 x 20 mm von Beckmann) verteilt und in einer BeckmanTM Airfuge Zentrifuge für 4 h bei 40 psi (mehr als 132000 x g) pelletiert. Das Hämocyanin-Pellet wurde danach mit Stabilisierungspuffer überschichtet, der mit Proteasehemmer versetzt war, und über Nacht auf dem Schüttler im Kühlraum gelöst. Am nächsten Tag konnte das resuspendierte Hämocyanin für weitere Versuche verwendet werden.

7.2 Konzentrationsbestimmung und Absorptionsspektrum des Hämocyanins

Um die Konzentration des Hämocyanins zu bestimmen, wurde ein Absorptionsspektrum von 220 nm bis 600 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 das oxygenierte aktive Zentrum des Hämocyanins (Cu-O₂-Cu-Komplex) ein Absorptionsmaximum und somit liefert die Messung bei dieser Wellenlänge gleichzeitig einen Nachweis des Hämocyanins in der Probe.

7.3 Dissoziation des Mollusken-Hämocyanins in seine Untereinheiten

Die Dissoziation des Hämocyanins in seine Untereinheiten erfolgte durch Überführung in ein alkalisches Medium und unter Entzug zweiwertigen Kationen (Ca²⁺, Mg²⁺). Dazu wurde die Probe in einen Dialyseschlauch (Visking Typ 2032 von Roth, Karlsruhe) gegeben, der zuvor

in H₂O aufgekocht wurde. Dieser wurde in ein mit 0,13 M Glycin-Puffer pH 9,6 gefülltes Becherglas gegeben und über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rühren dialysiert.

Glycin/NaOH-Puffer 0,13 M Glycin
 pH 9,6, mit NaOH eingestellt

7.4 Konzentrierung von Proteinproben

Um kleinere Volumina in Reaktionen einsetzen zu können, mussten die Proteinproben zum Teil aufkonzentriert werden. Dazu wurden zwei verschiedene Systeme verwendet, die im Folgenden kurz erläutert werden.

- ***Amicon Ultra-15-Filtrationssystem***

Bei diesem System wurden Zentrifugationssäulen mit einem Filtereinsatz verwendet, der für Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als <10000 durchlässig ist. Bei der Zentrifugation verblieb das Hämocyanin aufgrund seiner Größe im Filtereinsatz, während kleinere Moleküle und Wasser sich im Durchfluss befanden. Mittels dieser Methode konnten maximal 15 ml Probe auf ein Volumen von bis zu 200 µl eingengt werden. Die Zentrifugation wurde bei 2000 x g in der Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 R im Rotor 3360 bei 4 °C durchgeführt, wobei die Dauer in Abhängigkeit von dem Ausgangsvolumen variierte.

- ***Centrisart I-Zentrifugationssystem***

Zur Konzentrierung kleinerer Proteinmengen bis zu 2,5 ml wurden Centrisart I Zentrifugenröhrchen (Typ 13239-E; Fa. Sartorius, Göttingen) verwendet. Deren Membraneinsatz besitzt eine Durchlässigkeit für Moleküle <10000. Die Proteinprobe wurde dabei in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und anschließend ein zweites Röhrchen mit Membraneinsatz aufgesetzt, so dass in der darauf folgenden Zentrifugation kleinere Moleküle und Wasser durch die Membran gedrückt wurden. Das Hämocyaninkonzentrat befand sich im unteren Röhrchen. Die Zentrifugation wurde für 2 x 5 min bei 2000 x g in der Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 R im Rotor 3360 bei 4 °C durchgeführt.

7.5 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Proteine lassen sich aufgrund ihrer Ladung in einem elektrischen Feld auftrennen. Man verwendet dazu Polyacrylamidgele als Matrix, die sich aus einem großmaschigen Sammelgel und einem höhervernetzten Trenngel zusammensetzen, wodurch die Auflösung erhöht wird.

In Anwesenheit von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethyldiamin (TEMED) bildet Acrylamid lange Ketten, die wiederum von N,N'-Methylenbisacrylamid zu einer netzförmige Struktur verknüpft werden. Die Porengröße der Matrix wird durch die zugegebenen Konzentrationen an Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid festgelegt, so dass sich der Trennbereich an das jeweilige Protein anpassen lässt. **Tab. 3** zeigt die Korrelation zwischen Konzentration des Gels und dem Trennbereich der Proteine.

| Konzentration in % | Trennbereich in kDa |
|--------------------|---------------------|
| 3 | 100 – 1000 |
| 5 | 80 – 500 |
| 8 | 60 – 400 |
| 12 | 40 – 200 |
| 20 | 10 – 100 |

Tab. 3: Trenneigenschaft von Polyacrylamid-Gelen.

Die Elektrophorese erfolgte sowohl unter denaturierenden (SDS-PAGE), als auch unter nicht denaturierenden Bedingungen (native PAGE) nach Laemmli (1970).

- **SDS-PAGE**

Dieses Verfahren dient der Bestimmung des Molekulargewichts von einem monomeren Protein oder von den Untereinheiten eines oligomeren Proteins, wobei die elektrophoretische Auftrennung nur von der Molekülgröße abhängt. Durch die Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die Eigenladung des Proteins überdeckt, indem SDS in einem konstanten molaren Verhältnis an die Proteine bindet und diese dadurch mit einem negativen Mantel umgibt. Alle Proteine wandern daher zur Anode. Um anhand der Laufstrecke die Molmasse bestimmen zu können, wird zudem ein Marker mit Eichproteinen aufgetragen.

Als Molekulargewichtsmarker wurde das Proteingemisch „SDS-6H“ von Sigma (Deisenhofen) verwendet:

| Markersubstanz | Molekulargewicht |
|--------------------------|------------------|
| Myosin | 205.000 |
| β -Galactosidase | 116.000 |
| Phosphorylase B | 97.400 |
| Rinderserumalbumin (BSA) | 66.000 |
| Ovalbumin | 45.000 |
| Carboanhydrase | 29.000 |

Probenvorbereitung

4 x Probenpuffer

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

Die Proben wurden mit 25 % Probenpuffer versetzt und zusammen mit dem Marker auf dem Heizblock für mindestens 5 min bei 95 °C denaturiert.

- **Native PAGE**

Die native PAGE trennt die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse, ihrer spezifischen Eigenladung und ihrer Tertiärstruktur auf. Aus diesem Grund finden keine Behandlung mit SDS und β -Mercaptoethanol und keine Hitzedenaturierung bei 95 °C statt.

Probenvorbereitung

4 x-Probenpuffer

20 % Saccharose
 0,5 % Bromphenolblau

Die Hämolymphe wurde mit 4 x Probenpuffer bis zu einer 1 x Endkonzentration versetzt.

Gelherstellung

Für beide Systeme verwendete Lösungen:

| | |
|-------------------------------|---|
| Acrylamidlösung | (30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (Protogel-Fertiglösung; Helmut Schröder; Stuttgart) |
| Polymerisationsstarter | 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in dest. H ₂ O TEMED (N,N,N',N' - Tetramethylenethylen-diamin) |

Von System abhängige Lösungen :

| | SDS-PAGE | native PAGE |
|-----------------------------|--|---|
| Trenngelpuffer | 1,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS pH 8,8 | 60 mM Borsäure 1,32 M Tris pH 9,6 |
| 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 |

| | 5 % Trenngel | 7,5 % Trenngel | 10 % Trenngel | Sammelgel |
|------------------|--------------|----------------|---------------|-----------|
| Protogel | 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 |
| H ₂ O | 5,8 ml | 5 ml | 4,1 ml | 2 ml |
| TEMED | 3 µl | 3 µl | 3 µl | 3 µl |
| APS | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |

Es wurden Gele im Format 80 x 82 mm und 1 mm Dicke hergestellt. Vor dem Gießen des Gels wurde zwischen eine Ohrglasplatte und eine weitere Glasplatte an beiden Seiten ein *Spacer* gelegt, die Platten wurden anschließend mit zwei Klammern zusammengehalten und abgedichtet. Dies erfolgte entweder durch Verwendung von Klebeband oder mit 1 %iger Agaroselösung. Danach wurde zuerst das Trenngel angesetzt und bis etwa 1 cm unter den oberen Rand zwischen die beiden Platten gegossen. Das Trenngel wurde sofort mit destilliertem Wasser überschichtet, welches nach der Polymerisation (ca. 30 min) wieder entfernt wurde. Als nächstes wurde die Sammelgelmischung zwischen die Platten eingefüllt und umgehend der Probenkamm (13 Taschen) luftblasenfrei in das Sammelgel gesteckt.

Mobilisierungspuffer

25 mM Tris/HCl
 50 mM EDTA
 pH 8,3

Um die Proteine zu eluieren, wurden die Gelbanden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und in Stabilisierungspuffer homogenisiert, bis eine zähflüssige Masse entstand. Die Elution erfolgte über Nacht auf dem Schüttler in der Kühlkammer. Um die eluierten Proteinbanden von der Gelmatrix zu trennen, wurden Eppendorf-Gefäße nach dem in **Abb. 15** skizzierten Schema zusammengesteckt:

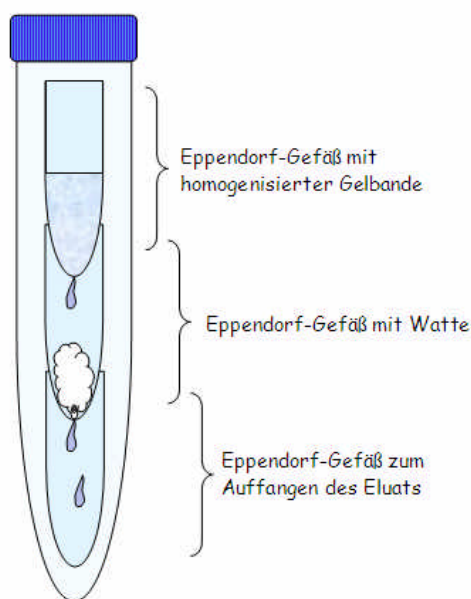


Abb. 15: Versuchsaufbau zur Elution einer Proteinbande aus einem präparativen Polyacrylamid-Gel.

Das Eppendorf-Gefäß mit der homogenisierten Gelbande wird mit einem Loch an der Unterseite versehen und in ein zweites Eppendorf-Gefäß gestellt. Dieses ist mit Watte gefüllt, Reste der Gelmatrix zurückzuhalten. Über eine Öffnung an der Unterseite kann das Eluat in einem dritten Eppendorf-Gefäß aufgefangen werden.

Anschließend wurde die Probe für 5 – 10 min bei 2000 x g zentrifugiert und das Eluat in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses wurde photometrisch gemessen und danach im SDS-Gel überprüft. Zudem konnten die eluierten Banden für Crossed-Line-Versuche eingesetzt werden.

7.6 Western Blot

Bei diesem *Blotting*-Verfahren werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis des gesuchten Proteins erfolgt durch Antikörper, die spezifisch gegen das Protein gerichtet sind.

Hier wurde ein *Semi-dry*-Elektroblotting (Khyse-Andersen, 1984) durchgeführt, wobei das elektrische Feld zwischen zwei horizontalen Metallplatten angelegt wurde.

Benötigte Lösungen:

| | |
|-----------------------------|--|
| Lösung 1 (pro Liter) | 25 mM Tris/Cl 20 % Methanol pH 10.4 |
| Lösung 2 (pro Liter) | 300 mM Tris/Cl 20 % Methanol pH 10.4 |
| Lösung 3 (pro Liter) | 25 mM Tris/Cl 40 mM Norleucin pH 9.4 |

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel wurde in Lösung 3 kurz geschwenkt. Die Nitrocellulose-Membran wurde in Lösung 1 getränkt. Anschließend erfolgte der Aufbau des Blots in einer Blotkammer (CTI, Idstein) nach dem in **Abb. 16** skizzierten Schema:

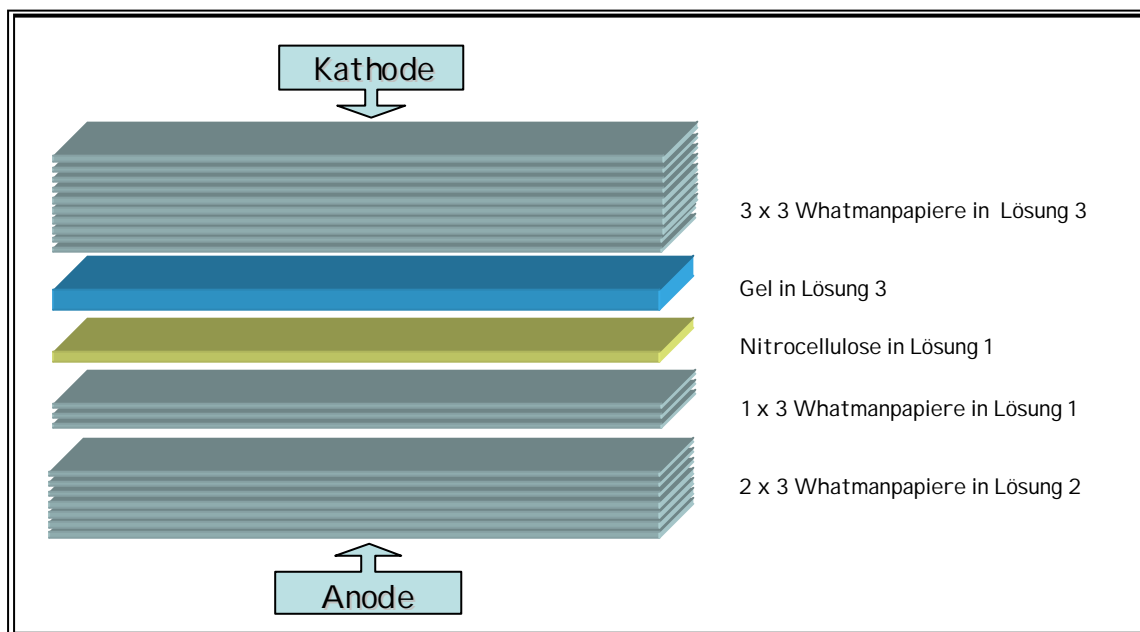


Abb. 16: Aufbau eines Western Blots.

Beim *Semi-dry* Blot werden das Gel und die Nitrocellulose-Membran, die sandwichartig von Filterpapieren eingeschlossen sind, zwischen die Elektroden gelegt. Das elektrische Feld ist dadurch senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt. Dabei wandern die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran und werden dort gebunden. Das mit Puffern getränkte Filterpapier dient bei der Elektrophorese als Ionen-Reservoir.

Der Transfer der Proteine fand bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche für 2 h statt.

Verwendete Lösungen:

| | |
|---------------------------|---|
| TBST (pro Liter) | 10 mM Tris/Cl 140 mM NaCl 0,1 % Tween 20 |
| Blockierungslösung | 5 % Milchpulver in TBST |
| Detektionspuffer | 0,1 M NaCl 0,1 M Tris/Cl 0,05 M MgCl ₂ |

Nach dem Blotting wurden die Proteine auf der Membran reversibel mit PonceauS-Lösung angefärbt und das sichtbare Muster auf eine transparente Folie übertragen. Danach wurde die Membran in ein Schälchen gegeben und in Blockierungslösung über Nacht auf dem Schüttler geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Am nächsten Tag wurde die Blockierungslösung aus dem Schälchen abgegossen und die Membranen anschließend dreimal mit TBST gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper für 1,5 h auf dem Schüttler, der zuvor mit TBST 1:10.000 verdünnt worden war. Dieser war jeweils spezifisch gegen das verwendete Hämocyanin gerichtet und stammte aus dem Kaninchen. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen. Nun wurde der 2. Antikörper dazugegeben. Bei diesem handelte es sich um einen Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper, der gegen den F_c-Teil des ersten Antikörpers gerichtet war. Zusätzlich war dieser mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt, welche die spätere Farbreaktion katalysierte. Die Inkubation auf dem Schüttler dauerte 1 h. Danach erfolgte nach drei Waschschritten mit TBST die Detektion. Dazu wurden zu 10 ml 1 x Detektionspuffer 66 µl NBT und 33 µl BCIP gegeben und die Membranen damit bedeckt. Nach 15 min wurde eine Färbung sichtbar. Das Prinzip der Farbreaktion ist in Kapitel 5.12 erläutert.

- ***Western Blot für Proteinsequenzierung***

Dieses Verfahren entspricht im Ablauf dem des oben beschriebenen Western Blots. Anstelle einer Nitrocellulose-Membran wird hier eine PVDF-Membran verwendet, die vor ihrem Gebrauch kurz in 100 % Methanol eingeweicht wurde. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran mit PonceauS angefärbt und die zu sequenzierenden Banden wurden ausgeschnitten.

- **PonceauS-Färbung**

Mittels der im vorherigen Abschnitt erwähnten PonceauS-Färbung kann man die transferierten Banden nach dem Westernblot reversibel sichtbar machen. Dazu werden die Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membran für 5 min in einer 1: 10 verdünnten PonceauS-Lösung (Sigma, Deisenhofen) gefärbt. Die rote Färbung kann durch Abspülen mit destilliertem Wasser wieder entfernt werden.

7.7 Limitierte proteolytische Spaltung

Die dialysierte Hämocyanin-Probe wurde mit folgenden Proteasen gespalten:

- Elastase Typ IV aus Schweinepankreas (Sigma/ No. E-0258)
- *Staphylococcus aureus*, strain V8 Endoproteinase Gluc-C (Fluka/ No. 45172)
- Trypsin Typ XIII aus Rinderpankreas (Sigma/ No. T-8642)
- Chymotrypsin Typ II Rinderpankreas (Sigma/ No. C-4129)
- *Astacus* Protease aus *Astacus spec.* (von Prof. W. Stöcker, Mainz)
- Papain aus *Papaya latex* (Sigma/ No. P-4762)
- Pepsin aus Magenschleimhaut vom Schwein (Sigma/ No. P-6887)
- Subtilisin Typ VIII aus *Bacillus licheniformis* (Sigma/ No. P-5380)

Vor ihrer Verwendung wurden die Proteasen entsprechend ihrem pH-Optimum gelöst.

Die jeweilige Protease wurde in einer Endkonzentration von 2 % (w/w) zu der Hämocyanin-Probe gegeben und in der Regel für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Abweichende Inkubationszeiten sind an entsprechenden Stellen aufgeführt.

7.8 Zweidimensionale Immunelektrophorese

Mittels dieser Methode, die nach Laurell (1965) und Weeke (1973) durchgeführt wurde, lassen sich wasserlösliche Proteine immunologisch charakterisieren.

In einem 1 %igen Agarosegel wird in der ersten Dimension ein Proteingemisch elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die unterschiedlichen Proteine aufgrund ihrer verschiedenen Ladungen unterschiedlich schnell von der Kathode zur Anode wandern. Das weite Gelnetz, was durch die niedrige Agarosekonzentration erreicht wird, lässt keinen Einfluss der Größe und Tertiärstruktur der Proteine zu.

In der zweiten Dimension werden die so aufgetrennten Proteine durch ein antikörperhaltiges 1 %iges Agarosegel geschickt. Handelt es sich bei dem Protein oder Proteinfragment um ein Antigen, so kommt es zur Ausbildung von Antigen-Antikörperkomplexen. Diese Komplexe

wandern im Gel solange weiter, bis deren Konzentration so hoch ist, dass sich ein dreidimensionales Netzwerk bildet. Hierbei entsteht ein charakteristisches gipfförmiges Präzipitat, das durch Anfärben sichtbar wird.

Anhand der Form der Gipfel lässt sich eine Aussage über die Verwandtschaft der Proteine treffen (**Abb. 17**).

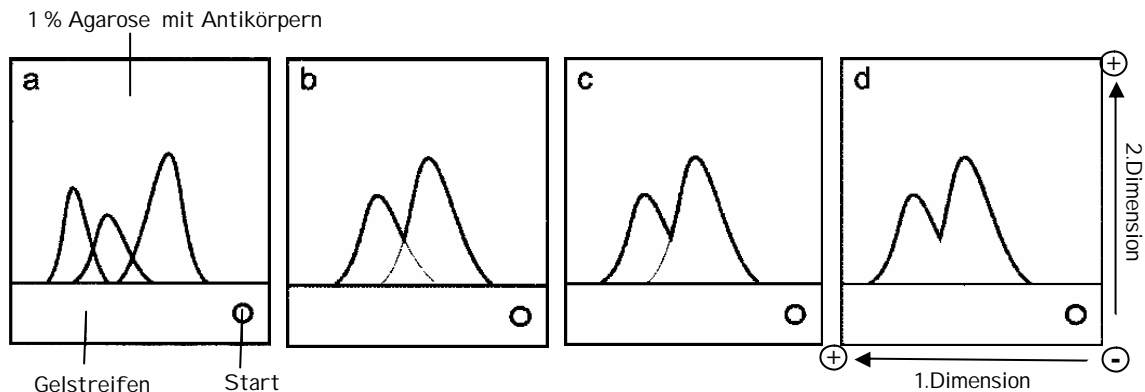


Abb. 17: Grundform der zweidimensionalen Immunelektrophorese mit möglichen Präzipitationsmustern.

a) immunologisch nicht identische Proteine; b) immunologisch partiell identische Proteine; c) siehe b), jedoch ist das linke Protein gegenüber dem rechten immunologisch unvollständig; d) immunologisch identische Proteine

Verwendete Lösungen:

Immunoelktrodenpuffer (5 x)

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 auf dem Heizblock aufkochen.

Waschlösung

0,6 % NaCl

Färbelösung

Methanol /Eisessig / Wasser (4:1:5 v/v/v)
0,2 % Coomassie Brilliant Blue G 250

Entfärbelösung

Isopropanol / Eisessig / Wasser (4:1:5 v/v/v)

• **Crossed Immunelektrophorese**

Durchführung:

1. Dimension:

Die Agarose wurde aufgeköcht und 10 ml der geschmolzenen Lösung wurden auf eine 7 x 10 cm große Glasplatte gegossen. Anhand einer Schablone wurden positionierte Löcher (2 - 4 mm Ø) in die erstarrte Agarose gestanzt, um darin die zu untersuchende Proteinprobe

(1 - 4 µg) aufzutragen. Die Lauffront wurde durch separates Mitlaufen von 2 µl eines Bromphenolblau-Saccharose-Markers (0,5 % BPB; 20 % Saccharose in H₂O) sichtbar gemacht.

Als Pufferbrücke diente Chromatographiepapier (Schleicher & Schuell, Dassel). Die Elektrophorese wurde bei 600 V in einer wassergekühlten (17 °C) Multiphor-Apparatur (Modell 2117; Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Sobald der Farbstoff das Gelende erreicht hatte, wurde die erste Dimension gestoppt.

2. Dimension:

Mittels einer Schablone wurde die Bahn der aufgetrennten Proteinprobe ausgeschnitten (1 x 4,2 cm) 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 temperierte Agarose wurde mit dem Antikörper gründlich gemischt und auf die freie Stelle des Gel Bond®- Films gegossen. Die Elektrophorese wurde auf die gleiche Weise, wie die erste Dimension, bei 300 V über Nacht durchgeführt.

Um das Präzipitat anzufärben, mussten zuerst überschüssige Antikörper entfernt werden. Dazu wurden die Immunelektrophoreseblättchen für 5 min unter angefeuchtetem Filterpapier gepresst und anschließend 10 min quellen gelassen, wobei diese Prozedur die ersten beiden Male mit 0,6 % NaCl-Lösung und das letzte Mal mit H₂O durchgeführt wurde.

Abschließend wurde ein letztes Mal mit in dest. H₂O getränktem Filterpapier gepresst und die Filme mit einem Föhn getrocknet.

Die trockenen Filme wurden für ca. 4 min in die Färbelösung gegeben und danach in Entfärberlösung geschwenkt, bis sich der Hintergrund entfärbte und die Gipfel klar hervortraten.

Anschließend wurden die Filme erneut mit dem Föhn getrocknet.

- ***Crossed-Line-Immunelektrophorese***

Bei dieser spezialisierten Technik nach Kroll (1973) wird zwischen dem Gießen der zweiten Dimension und deren Lauf an der Grenze des Gelstreifens ein Trog ausgeschnitten (30 mm x 4 mm groß). In den Trog wird ein mit Agarose vermischtes Protein hineinpipettiert (Line) und dessen immunologische Verwandtschaft mit der ursprünglich eingesetzten Proteinprobe untersucht (**Abb. 18**).

Besteht eine strukturelle Verwandtschaft zwischen den Proteinen, fusioniert das Line-Protein mit dem Hauptprotein; besteht keine Verwandtschaft, werden sie unabhängig voneinander präzipitiert.

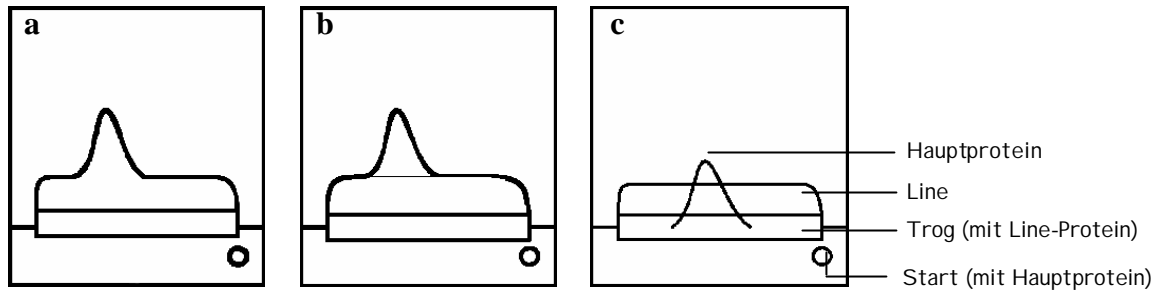


Abb. 18: Crossed-Line-Immunelektrophorese und mögliche Präzipitationsmuster.

a) Das Hauptprotein und das Line-Protein sind immunologisch identisch. b) Die beiden Proteine sind immunologisch verwandt. Das Line-Protein trägt zusätzliche Epitope, die von den Antikörpern erkannt werden. c) Die beiden Proteine sind immunologisch nicht miteinander verwandt.

7.9 Anionenaustauschchromatographie

Das Verfahren der Flüssigkeitschromatographie wurde verwendet, um einzelne Proteinfragmente eines Substanzgemisches (z.B. eines Protease-Verdaus) aufzutrennen. Der schematische Aufbau des Trennsystems ist in **Abb. 19** skizziert. Dieses entspricht einer HPLC-Apparatur, wobei allerdings die Probenauftrennung nur unter niedrigem Druck durchgeführt wurde.

Verwendete Lösungen:

| | |
|---------------------|--|
| Trennsäule | Q Sepharose (Pharmacia) |
| Laufmittel A | 50 mM Tris 5 mM CaCl ₂ 5 mM MgCl ₂ pH 7,0 |
| Laufmittel B | 50 mM Tris 5 mM CaCl ₂ 5 mM MgCl ₂ 1 M NaCl pH 7,0 |
| Flußrate | 0,5 ml / min bei Raumtemperatur |
| Wellenlänge | 280 nm |
| Gradient | linearer Gradient von 0 - 50 % B in 0 - 160 min |

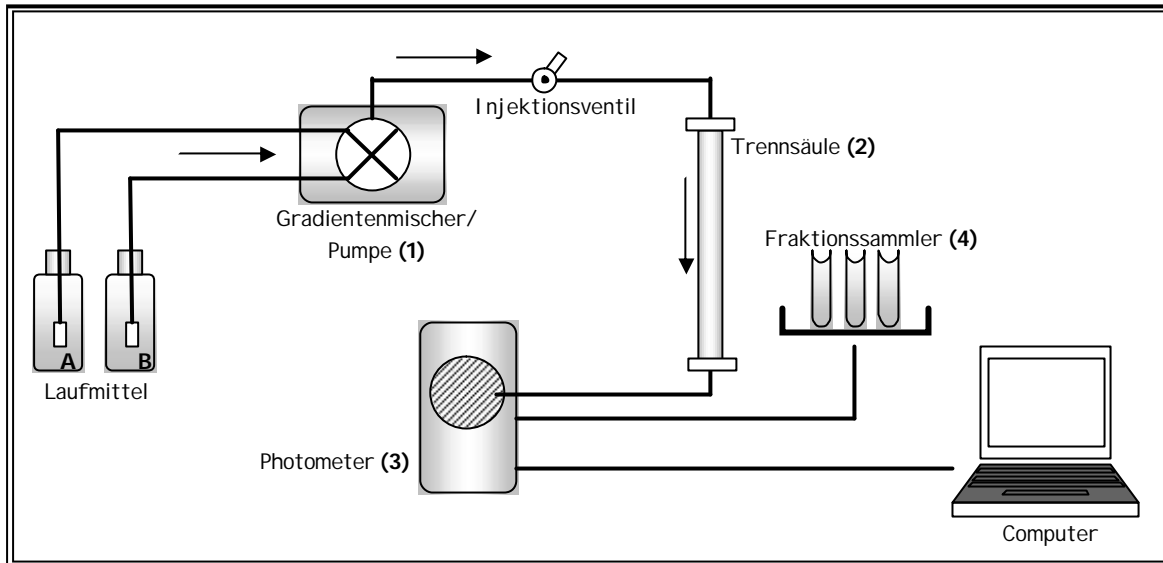


Abb. 19: Schematischer Aufbau der HPLC-Apparatur.

Das Proteingemisch, das am Injektionsventil aufgetragen wird, wird über eine Anionenaustauschersäule aufgetrennt. Die eluierten Proteine werden in einem Fraktionssammler aufgefangen und deren Konzentration photometrisch bestimmt. Ein Computer zeichnet das Elutionsprofil auf.

1. Gilson Präzisionspumpe, Modell 321
2. Glassäule mit Q-Sepharose, Länge 30 cm, Durchmesser 14 mm, Volumen 46 ml
3. Gilson Detektor / Photometer, Modell UV/vis -151
4. Gilson Fraktionssammler, Modell FC 203 B

Die Anlage beginnt mit einem Gradientenmischer, in dem die Laufmittel A und B (mobile Phase) in einem zuvor definierten Verhältnis miteinander gemischt werden. Daran schließt sich eine Pumpe an, die die Flüssigkeit mit einem Druck von maximal 8 bar auf die darauf folgende Trennsäule (stationäre Phase) vorantreibt. Dazwischen befindet sich ein Injektionsventil, auf dem die Probe aufgebracht wird. Durchläuft die Probe die Trennsäule, welche als ionische Gruppe $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ trägt, so wird sie dort aufgrund ihrer Polarität und den Eigenschaften der Säule aufgetrennt. Die eluierten Fraktionen werden anschließend in einem Photometer bei 280 nm gemessen, um deren Konzentration zu bestimmen. Im nachgeschalteten Computer kann ein Elutionsprofil erstellt werden, in dem die Absorptionen als Peaks dargestellt werden.

7.10 Gelfiltration

Bei dieser Methode werden Proteine ihrer Größe nach über eine Säule aufgetrennt. Die Säule enthält Gelkügelchen, die eine bestimmte Porengröße aufweisen. Wird nun ein Substanzgemisch aus Proteinen unterschiedlicher Größe auf die Säule aufgetragen, so werden

die kleineren Moleküle in den Hohlräumen der Gelkugeln zurückgehalten. Große Moleküle dagegen können die Säule ungehindert passieren und werden früher eluiert.

Die Econo-Chromatographiesäule (120 cm lang, Durchmesser von 1,5 cm, Bettvolumen von 230 ml) wurde mit dem Säulenmaterial BioGel A 15m (BioRad, München) beladen. Auf die Säule wurde die Probe aufgetragen, deren Volumen 1 ml nicht überschreiten sollte. Als Lauf- und Elutionspuffer wurde Tris-Stabilisierungspuffer (pH 7,4) verwendet. Der Verlauf der Gelfiltration wurde mittels des GilsonM 115 UV-Detektor (Abimed, Langenfelden) gemessen, der eine Veränderung der Extinktion bei 280 nm misst. Die eluierten Proteine wurden mit dem Fraktionssammler Gilson FC 203 (Abimed, Langenfelden) in 80 Fraktionen von je 2 ml aufgefangen. Dabei wurde zugleich ein Elutionsprofil durch den Flachbrettschreiber BD 112 (Kipp & Zonen, Holland) erstellt, anhand dessen sich die detektierten Peaks den einzelnen Fraktionen zuordnen und deren Konzentration bestimmen ließen.

7.11 Lectin-Bindungstest

Um das Vorhandensein von N-glykosidischen Zuckern quantitativ nachzuweisen, wurde ein mit Biotin gekoppeltes Lektin (Sigma, Deisenhofen) eingesetzt. Dieses stammt aus *Triticum vulgare* und besitzt eine Affinität zu N-acetyl- β -D-glucosaminylresten und N-acetyl- β -D-glucosamin-Oligomeren.

Verwendete Lösungen:

| | |
|---|--|
| TBS | 50 mmol Tris/Cl 150 mmol NaCl pH 7,5 |
| Puffer 1 | 50 mmol Tris/Cl 150 mmol NaCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM MnCl ₂ 1 mM CaCl ₂ pH 7,5 |
| Puffer 2 | 100 mM Tris/Cl 50 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl pH 9,5 |
| Streptavidin-Alkalische Phosphatase | 1:500 eingesetzt |
| NBT (Nitro Blue Tetrazolium) | 50 mg/ml in 70 %iges Dimethylformamid (DMF) |
| BCIP (5-Bromo-4-Chloro-indolyl-Phosphat) | 50 mg/ml in 100 %iges Dimethylformamid (DMF) |

Die zu untersuchenden Glycoproteine wurden direkt auf eine Nitrocellulose-Membran aufgebracht. Die Glycoproteine wurden in einer Konzentration von 5 µg und 10 µg eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde das Intermediärfilament Vimentin verwendet, das in den gleichen Konzentrationen aufgetragen wurde.

Nach Immobilisierung der Proteine wurde die Membran für 1 h in Blockierungslösung geschwenkt. Dafür wurde 2 %ige-Rinderserumalbumin(BSA)-TBS-Lösung (pH 7,5) verwendet. Anschließend erfolgten drei 10minütige Waschschriffe, wobei die ersten beiden Male TBS und beim letzten Mal Puffer 1 eingesetzt wurde. Danach wurde das Lektin 1:100 in Puffer 1 verdünnt und die Membran damit 1 h unter Schwenken inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal für 10 min mit TBS gewaschen. Streptavidin-Alkalische Phosphatase wurde im Verhältnis 1:5000 in TBS verdünnt und die Membran darin für 1 h geschwenkt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS für 10 min erfolgte die Färbereaktion. Dazu wurden NBT und BCIP in Puffer 2 gemischt und über die Membran gegeben. Nach dem Auftreten einer deutlichen Farbentwicklung nach wenigen Minuten wurde die Reaktion mit Wasser abgestoppt und die Membran getrocknet.

8. *Transmissions-Elektronenmikroskopie*

Man benötigt dazu mit einem Kohlenstoff-Film beschichtete Kupfernetzchen mit 300 – 400 Maschen, die mir freundlicherweise fertig zur Verfügung gestellt wurden. Kurz vor der Beladung mit der Proteinprobe wurden die Netzchen in einer Aufdampfanlage einer Hitzeentladung ausgesetzt, um die Kohlenstoffoberfläche hydrophil und somit für das Protein adsorptionsfähiger zu machen. Für die EM-Präparation wurde die *single-troplet*-Methode im „*Negative-Staining*“-Verfahren angewendet (Harris & Horne, 1991). Dazu wurden auf Parafilm folgende Tropfen untereinander vorgelegt:

- 1 Tropfen Proteinlösung (0,05 - 0,5 mg/ml)
- 3 Tropfen Aqua dest.
- 1 Tropfen Kontrastierungsmittel: 2 % Uranylacetat

Das Netzchen wurde nun mit einer Pinzette vorsichtig in der oben aufgeführten Reihenfolge mit der Kohlenstoffoberfläche durch die Lösungen gezogen, wobei zwischen den einzelnen Tropfen das Netzchen mittels eines Filterpapiers trocken gesaugt wurde. Das Netzchen wurde anschließend auf Filterpapier in einer Petrischale getrocknet und dort bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Untersuchung der Präparate wurde in einem Zeiss EM 900 Transmissions-Elektronenmikroskop durchgeführt, wobei Aufnahmen auf Kodak EM-Filmen (Typ 4489) festgehalten wurden.

C Ergebnisse

1. *Ablauf und Strategie der Projekts*

Die Sequenzierung des Hämocyanins der Muschel *Nucula nucleus* (NnH) war ein wesentliches Ziel meiner Doktorarbeit, wobei ich bereits auf Teilsequenzen zurückgreifen konnte, die ich in meiner Diplomarbeit entschlüsselt hatte. Zu Beginn der Dissertation gingen wir nur von einem einzigen Hämocyanin aus, da bisher keine der Sequenzen auf die Existenz von Isoformen funktioneller Domänen hinwies. In meiner Diplomarbeit konnten folgende drei Fragmente isoliert werden: eine Teilsequenz aus NnH-*ef* und eine zweite aus NnH-*fg*, die eine Überlappung in NnH-*f* zeigen, so dass diese Domäne vollständig sequenziert wurde. Zudem wurde ein 400 bp-Fragment isoliert und NnH-*c* zugeordnet, was allerdings aufgrund der geringen Größe noch zu verifizieren war. Bei allen Fragmenten handelte es sich um genomische Sequenzen, belegt durch die Linkerintrons zwischen NnH-*ef* und NnH-*fg* und das interne Intron in NnH-*c*. Diese Sequenzen wurden zu Beginn der Doktorarbeit dazu benutzt, DNA-Sonden zum Screening einer bereits vorhandenen genomischen Bank sowie spezifische Primer herzustellen. Zudem wurde neue RNA präpariert, mit Hilfe derer schließlich zwei Isoformen des NnH gefunden und vollständig sequenziert werden konnten.

Neben der Sequenzierung des Hämocyanins wurde dieses auch mit biochemischen Methoden charakterisiert, wozu die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und die Immunelektrophorese durchgeführt wurden.

Parallel zu der Sequenzierung des Muschel-Hämocyanins wurde das Hämocyanin des Cephalopoden *Nautilus pompilius* (NpH) untersucht. Dazu wurde zuerst aus der Mitteldarmdrüse RNA präpariert und mit dieser wurden unter Verwendung von degenerierten Primern RT-PCR-Reaktionen durchgeführt. Die dabei erhaltenen Fragmente dienten gleichzeitig zur Herstellung von Sonden, mit Hilfe derer eine von Herrn Dr. Bernhard Lieb hergestellte genomische Bank durchsucht werden sollte. Nach der Zuordnung der isolierten Sequenzen zu den entsprechenden Domänen wurden daraus NpH-spezifische Primer hergestellt. Um gezielt die Sequenzlücken innerhalb des Gens zu schließen, wurden mittels der Kombination aus spezifischen und degenerierten Primern weitere RT-PCR-Reaktionen durchgeführt. Die endständigen Sequenzen erhielt ich durch 5'- und 3'-RACE. Nachdem die komplette cDNA-Sequenz von NpH und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz bekannt war, konnte ich daraus gezielt Primer zur Überprüfung von internen und Linkerintrons synthetisieren. Für die genomische PCR musste zudem DNA extrahiert werden, wozu Mantelgewebe verwendet wurde.

Um das Hämocyanin von *Nautilus pompilius* auch biochemisch sowie immunologisch zu charakterisieren, wurden native und SDS-Gele angefertigt. Zudem wurde NpH mittels Immunelektrophorese untersucht, wofür unterschiedliche Spaltungen des Hämocyanins mit Proteasen zum Einsatz kamen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zuerst von *Nucula nucleus* und anschließend von *Nautilus pompilius* dargestellt. Die Klone oder Fragmente sind chronologisch aufgelistet, wobei ich nur solche erwähne, die zur Zusammensetzung der vollständigen Sequenz verwendet wurden.

2. *Nucula nucleus*-Hämocyanin (NnH)

2.1 Isolierung der DNA-Klone der beiden Isoformen

Zu Beginn der Arbeit wurde eine RT-PCR mit degenerierten Primern durchgeführt, für die die während der Diplomarbeit präparierte RNA eingesetzt wurde. Dabei konnten zwei Fragmente von ~3400 bp und ~3000 bp erhalten werden, die sich allerdings als genomisch herausstellten (**Abb. 20** und **Tab. 5**). Das erste codiert im Bereich von NnH1-*cd*, das zweite einen Teil von NnH1-*gh*. Beide Fragmente umfassen das dazwischen liegende Linkerintrin. Zwischen NnH-*c* und NnH-*d* beträgt dieses etwa 1300 bp, während das Linkerintrin zwischen NnH-*g* und NnH-*h* eine Länge von ungefähr 2000 bp aufweist. Zusätzlich konnte ein internes Intron in NnH-*d* 168 bp nach Beginn der Protein-Domäne nachgewiesen werden, das 1239 bp lang ist und in Phase 1 vorliegt.

Gleichzeitig wurde eine bereits vorhandene genomische Bank durchsucht, deren Primärtiter $1,5 \times 10^7$ pfu betrug. Zur Detektion wurde eine Sonde aus der Domäne NnH-*e* hergestellt, wozu als Template ein Klon aus meiner Diplomarbeit verwendet wurde. Damit konnte ein Fragment von 2800 bp isoliert werden, das die vollständige Domäne NnH-*e* umfasst und beiderseits im Linkerintrin endet. Zudem befand sich 244 bp *upstream* ein internes Intron, das in Phase 2 vorliegt und eine Länge von etwa 630 bp besitzt.

Da die Introns des *Nucula nucleus*-Hämocyanins sehr lang sind und die Sequenzierung der Fragmente sich schwierig gestaltete, wurde aus einer Muschel neue RNA mittels der GTC-Methode präpariert. Die reverse Transkription wurde mit degenerierten Primern durchgeführt, die in der anschließenden PCR sowohl mit degenerierten als auch mit spezifischen Primern kombiniert wurden. Die dabei amplifizierten Banden, deren Größe mit der kalkulierten Fragmentlänge übereinstimmte, wurden kloniert und anschließend sequenziert. Überraschenderweise wurden bei der Auswertung mehr unbekannte Sequenzen gefunden, als theoretisch bei einem solitären Hämocyanin vorhanden sein konnten. Dieser Befund legte die

Existenz einer zweiten Isoform nahe, was sich bei der weiteren Sequenzanalyse bestätigte. Mittels eines Alignments wurden die Sequenzen den entsprechenden Domänen zugeordnet. Wie sich dabei herausstellte, stammten fast alle bis zum Zeitpunkt der neuen RNA-Präparation gefundenen Sequenzen aus einer Isoform, die daher als NnH1 bezeichnet wurde. Das 400 bp-Fragment aus meiner Diplomarbeit, das der Domäne *c* zugewiesen wurde, codierte allerdings für die zweite Isoform (NnH2). Viele erhaltene Sequenzen, insbesondere solche innerhalb einer Domäne, deren Überlappung nur in der Primersequenz lag, wurden mittels PCR erneut überprüft, um eine ‚Durchmischung‘ der beiden Isoformen in der letztlich ermittelten Gesamtsequenz ausschließen zu können. Dabei wurde ein Überlappungsbereich von etwa 200 – 300 bp ausgewählt. Um die noch fehlenden Domänen zu analysieren, wurden im Anschluss spezifische Primer bestellt, die zur RT-PCR eingesetzt wurden. Die endständigen Sequenzen im 5'- und 3'-Bereich konnten mittels spezifischer RACE-Kits isoliert werden.

In **Abb. 20** sind die zur Zusammensetzung der Isoformen verwendeten Klone graphisch dargestellt, die von oben nach unten in der Reihenfolge ihrer Isolierung aufgeführt sind. **Tab. 4** und **Tab. 5** liefern dazu einen Überblick über die einzelnen Klone, deren Länge und deren Ursprung. Die Bezeichnung ‚Klon‘ wurde für PCR-Fragmente, klonierte DNA-Banden und DNA-Klone aus der genomischen Bank gleichermaßen gewählt, da es sich bei allen um eine Population genetisch identischer DNA-Moleküle handelt. Die mit Stern markierten Klone sind genomische Fragmente, die mindestens eine Intronsequenz enthalten. Dass diese auch bei Klonen auftreten, die aus RT-PCRs stammen, liegt an dem nicht durchgeführten DNase-Verdau und der daraus folgenden Amplifikation genomischer Fragmente in der PCR-Reaktion. Auf den DNase-Verdau wurde mit dem Ziel verzichtet, auch für die Analyse des Hämocyanins relevante genomische Sequenzen zu erhalten, was ja gelang. Die Intronsequenzen sind an dieser Stelle noch nicht aufgeführt; **Abb. 20** zeigt lediglich die codierenden Bereiche.

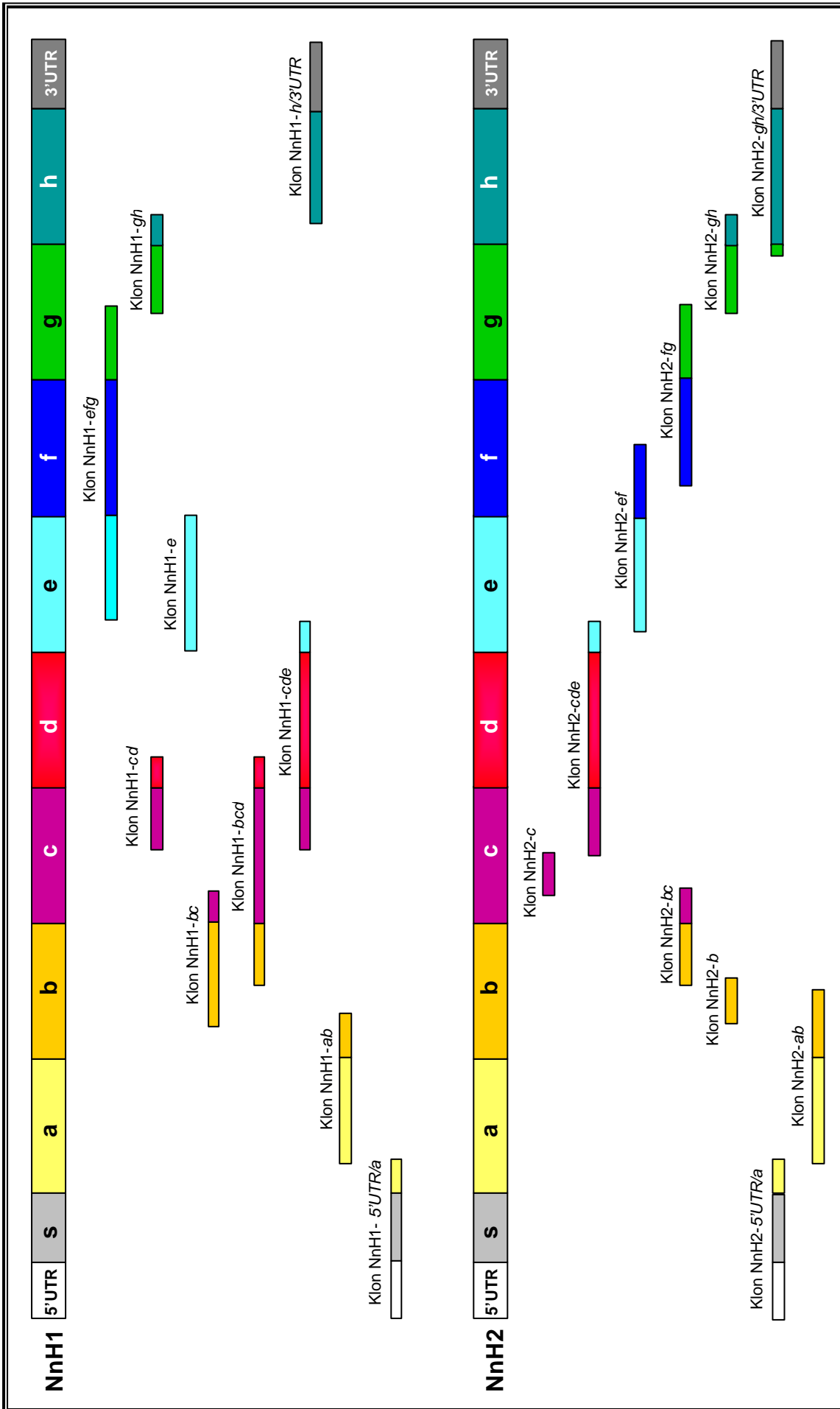


Abb. 20: DNA-Klone der beiden Isoformen von *Nucula nucleus*-Hämocyanin.

Die isolierten Klone sind in chronologischer Reihenfolge aufgeführt. Ihre Größe symbolisiert in etwa ihre tatsächliche Länge. Die einzelnen FUs sind mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet, dementsprechend auch die Klone.

| Domäne | Größe | Herkunft |
|----------------------|----------|--------------|
| *NnH1- <i>efg</i> | ~5450 bp | Diplomarbeit |
| *NnH1- <i>cd</i> | ~3400 bp | RT-PCR |
| *NnH1- <i>gh</i> | ~3000 bp | RT-PCR |
| *NnH1- <i>e</i> | ~2800 bp | Screening |
| NnH1- <i>bc</i> | ~1200 bp | RT-PCR |
| NnH1- <i>bcd</i> | ~1800 bp | RT-PCR |
| NnH1- <i>cde</i> | ~2000 bp | RT-PCR |
| NnH1- <i>h/3'UTR</i> | ~2000 bp | 3'RACE |
| NnH1- <i>ab</i> | ~1200 bp | RT-PCR |
| NnH1- <i>5'UTR/a</i> | ~400 bp | 5'RACE |

Tab. 4: Auflistung der isolierten Klone von NnH1.

Die mit Stern markierten Klone sind genomische Fragmente, die mindestens ein Intron enthalten.

| Domäne | Größe | Herkunft |
|-----------------------|----------|--------------|
| *NnH2- <i>c</i> | 984 bp | Diplomarbeit |
| NnH2- <i>cde</i> | ~2000 bp | RT-PCR |
| NnH2- <i>ef</i> | ~1600 bp | RT-PCR |
| NnH2- <i>fg</i> | ~1600 bp | RT-PCR |
| NnH2- <i>bc</i> | ~900 bp | RT-PCR |
| NnH2- <i>b</i> | ~400 bp | RT-PCR |
| NnH2- <i>gh</i> | ~900 bp | RT-PCR |
| NnH2- <i>gh/3'UTR</i> | ~2500 bp | 3'RACE |
| NnH2- <i>5'UTR/a</i> | ~400 bp | 5'RACE |
| NnH2- <i>ab</i> | ~1200 bp | RT-PCR |

Tab. 5: Auflistung der isolierten Klone von NnH2.

Der mit Stern markierte Klon ist ein genomisches Fragment, das ein Intron enthält.

Die vollständige cDNA-Sequenz von NnH1 hat eine Länge von insgesamt 11090 bp. Die Sequenz beginnt mit einem 5'UTR von 75 bp. Daran schließt sich das offene Leseraster (open reading frame; ORF) mit 10224 bp an. Es besteht aus einem 57 bp langem Signalpeptid und der für die acht Domänen codierenden Sequenz von 3389 Aminosäuren (**Abb. 21**). Die Größe der einzelnen FUs reicht von 399 Aminosäuren bis 420 Aminosäuren mit Ausnahme von NnH1-*h*, die durch eine Extension um 101 Aminosäuren eine Länge von 508 Aminosäuren aufweist. An Position 3409 Aminosäuren befindet sich mit TAA das erste Stopcodon, auf das ein 3'UTR von 791 bp folgt. Dieser umfasst das Polyadenylierungssignal AATAAA und einen 103 bp langen PolyA-Schwanz. Die errechnete Molekülmasse beträgt etwa 385 kDa.

Die Sequenz von NnH1 ist in der EMBL-Datenbank unter der Accession-Nummer AJ786639 zu finden. In **Abb. 21** ist die abgeleitete Aminosäuresequenz aufgeführt, wobei die einzelnen FUs verschieden farbig unterlegt sind. Die dazugehörige Nukleotidsequenz befindet sich im Anhang.

Die vollständige cDNA-Sequenz von NnH2 hat eine Länge von insgesamt 10849 bp. Der Aufbau entspricht dem der cDNA von NnH1. Zu Beginn liegt ein 47 bp langer 5'UTR vor, an dem sich ein ORF von 10155 bp anschließt. Das offene Leseraster besteht aus einem 48 bp langen Signalpeptid und der für die acht Domänen codierenden Sequenz von 3369 Aminosäuren (**Abb. 22**). Auch hier weist NnH2-*h* mit einer Länge von 504 Aminosäuren eine Extension von 95 Aminosäuren auf, während die anderen funktionellen Domänen zwischen 402 Aminosäuren und 419 Aminosäuren lang sind. An Position 3386 Aminosäuren liegt mit TGA das erste Stopcodon, auf das ein 3'UTR von 647 bp folgt. Dieser enthält das Polyadenylierungssignal AATAAA und einen 39 bp langen PolyA-Schwanz. Die errechnete Molekülmasse beträgt etwa 387 kDa.

Unter der Accession-Nummer AJ786640 ist die Sequenz von NnH2 in der EMBL-Datenbank zu finden. Die nachstehende **Abb. 22** zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz, wobei die einzelnen FUs verschieden farbig unterlegt sind. Die dazugehörige Nukleotidsequenz befindet sich auch hier im Anhang.



Abb. 21: Abgeleitete Aminosäuresequenz von NnH1.

Das Signalpeptid und die einzelnen FUs sind verschieden farbig markiert:

Signalpeptid NnH1-a NnH1-b NnH1-c NnH1-d NnH1-e NnH1-f NnH1-g NnH1-h





Abb. 22: Abgeleitete Aminosäuresequenz von NnH2.

Das Signalpeptid und die einzelnen FUs sind verschieden farblich markiert:

Signalpeptid NnH2-a NnH2-b NnH2-c NnH2-d NnH2-e NnH2-f NnH2-g NnH2-h



2.2 Genomische Sequenz der beiden Isoformen

Wie bereits erwähnt, wurde bei der RNA-Präparation auf einen DNase-Verdau verzichtet, so dass ein Teil der isolierten Fragmente genomischer Herkunft war. Diese zeigten die typischen Linkerintrons, die in Phase und Position mit denen von bereits bekannten Mollusken-Hämocyaninen übereinstimmten. Daneben wurden auch drei interne Introns gefunden, die in **Abb. 23** verdeutlicht sind. Diese unterscheiden sich von den bisher bekannten internen Introns in ihrer Position und sind in ihrer Phase unterschiedlich. Alle Introns zeigen die typische Splice-site GT/CAG.

Auffällig an den Introns von *Nucula nucleus*-Hämocyanin war vor allem ihre Länge mit meist mehr als 1 kb, was Schwierigkeiten bei der Sequenzierung bereitete. Zudem wollte ich versuchen, die entsprechenden internen Introns in der anderen Isoform zu finden. Dazu wurde DNA einer gesamten Muschel präpariert. Im Ergebnis wies NnH1-*c* kein internes Intron auf. Bei NnH2-*d* und NnH2-*e* fand trotz zahlreicher Versuche mit unterschiedlichen Polymerasen und Primerkombinationen keine PCR-Reaktion statt. Daraus könnte man schlussfolgern, dass sich in beiden Domänen ein Intron befindet, was die Polymerisation erschwerte und zum Abbruch der PCR-Reaktion führte. Ein direkter Nachweis für ein internes Intron konnte allerdings nicht erbracht werden. Die Analyse der genomischen Hämocyanin-Sequenz ist somit unvollständig und bei den in **Abb. 23** nicht aufgeführten Domänen ist diese noch unklar.

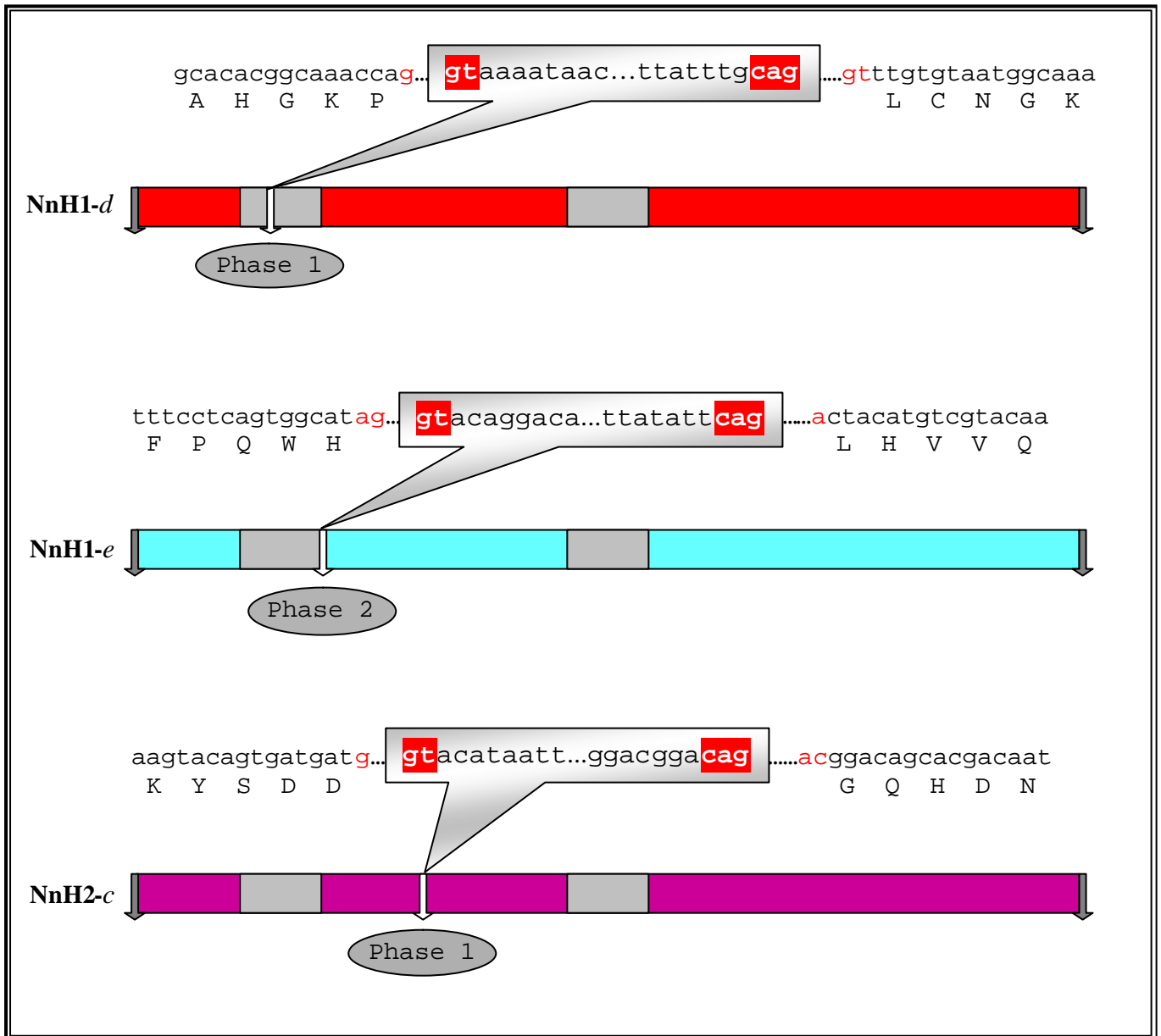


Abb. 23: Interne Introns in beiden Isoformen von *Nucula nucleus*-Hämocyanin.

Die FUs sind entsprechend ihrer Zuordnung farbig gekennzeichnet, die Kupferbindungsstellen sind grau markiert. Linkerintrons sind mit grauem Pfeil, interne Introns mit weißem Pfeil hervorgehoben. Die die Introns flankierenden Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen sind angegeben, wobei das durch das Intron getrennte Codon rot markiert ist. Anfang und Ende des Introns sind im grauen Kasten aufgeführt, wobei die Splice-sites rot unterlegt sind. Die Position der internen Introns wurde annähernd der Lage in der Domäne angepasst.

2.3 Biochemische Untersuchungen

Um das Hämocyanin von *Nucula nucleus* auch auf proteinbiochemischer Ebene zu untersuchen, wurde von etwa 50 noch lebenden Muscheln Hämolymphe entnommen. Nach deren Aufreinigung wurde sie auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen und die proteinhaltigen Fraktionen in einem SDS-Gel überprüft, um die Polypeptidketten darzustellen. Der Hauptgipfel zeigte im Gel eine Bande bei etwa 400 kDa, die allerdings von einem Schmier kleinerer Fragmente begleitet wurde. Dabei handelte es sich um das Hämocyanin von *Nucula nucleus* und dessen Abbauprodukten, wovon insgesamt etwa 2 mg erhalten wurden. Ein zweiter kleinerer Peak enthielt Proteine mit einer Größe von etwa 100 kDa, wobei es sich um ein weiteres Hämolymphe-Protein handeln könnte. Zur Untersuchung der Quartärstruktur von NnH wurden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt (**Abb. 24**). Diese zeigen hauptsächlich Didekamere, aber auch zu einem geringeren Teil Tridekamere und Dekamere.

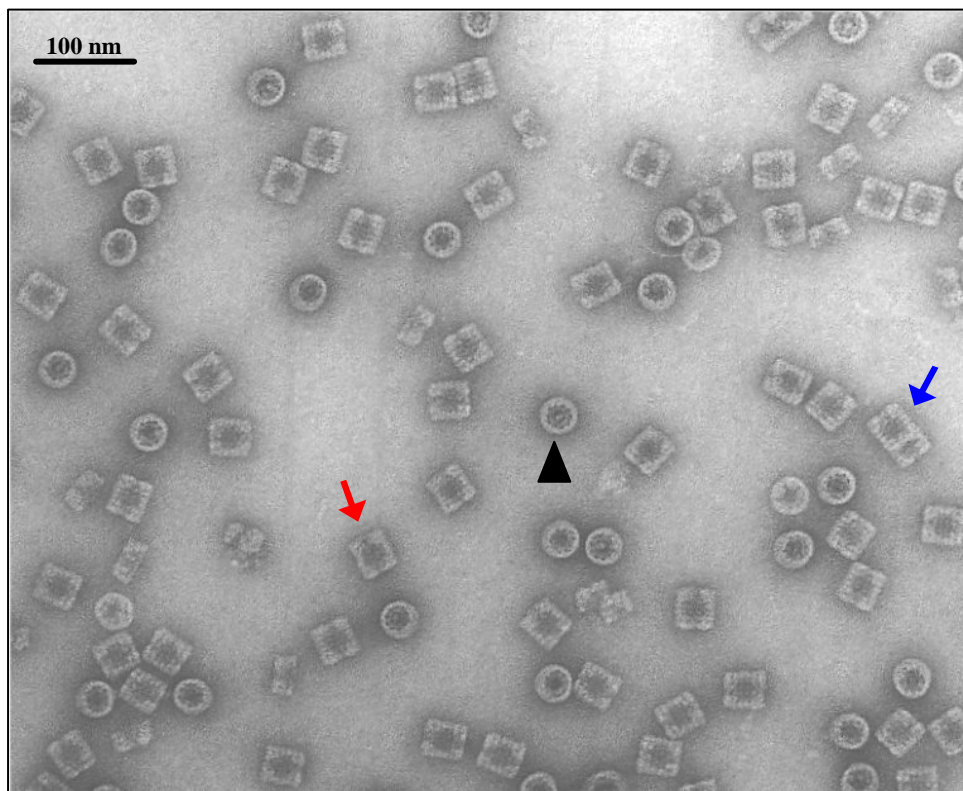


Abb. 24: Transmissions-Elektronenmikroskopie von *Nucula nucleus*-Hämocyanin.

NnH liegt hauptsächlich als Didekamer vor (roter Pfeil). Zu einem geringeren Teil findet man auch Tridekamere (blauer Pfeil). Zudem sind auch einige Dekamere vorhanden, die vermutlich aus Abspaltungen von größeren Komplexen hervorgegangen sind. Die EM-Bilder zeigen fast ausschließlich zwei Ansichten des Hämocyanins, zum einen die Top-Ansicht (Pfeilspitze), zum anderen die Seitenansicht (farbige Pfeile). Negativkontrastierung mit 2 % Uranylacetat.

Um die Größe der Hämocyanin-Untereinheit von *Nucula nucleus* besser abschätzen zu können, wurde es mit den Hämocyanin-Untereinheiten von *Rapana thomasi* (RtH) und *Nucula hanleyi* (NhH) aufgetragen (**Abb. 25**).

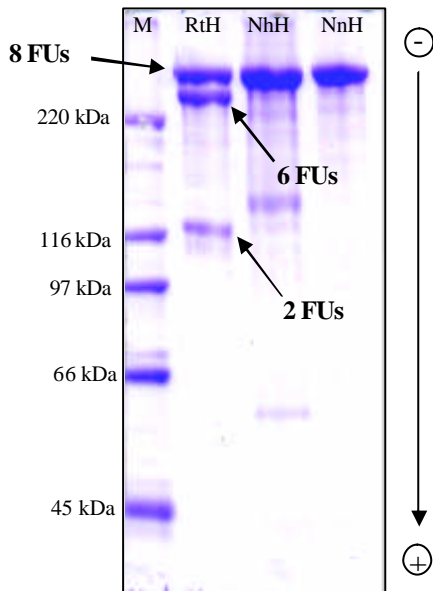


Abb. 25: 7,5 %ige SDS-PAGE von *Nucula nucleus*-Hämocyanin.

Neben dem Marker sind die Hämocyanine von *Rapana thomasi* (RtH) und *Nucula hanleyi* (NhH) als Vergleich aufgetragen. Die Proben wurden in einer Konzentration von 5 µg eingesetzt. Bei allen Hämocyaninen wandert die Hauptbande im Gel auf einer Höhe. Da von RtH bereits bekannt ist, dass die langsamste Bande aus acht Domänen besteht und eine Molekülmasse von 400 kDa besitzt, kann für die beiden Muschel-Hämocyanine die gleiche Situation angenommen werden.

Das Hämocyanin von *Rapana thomasi* besteht aus zwei verschiedenen Isoformen, deren Untereinheiten ein unterschiedliches Laufverhalten in der SDS-PAGE zeigen. Während die acht Domänen von RtH1 mit einer Molekülmasse von 400 kDa im Gel als eine Bande laufen, zerfällt RtH2 in ein 6-Domänen- und ein 2-Domänen-Fragment. Da die Untereinheit der beiden Muschel-Hämocyanine auf der gleichen Höhe wie RtH1 wandert, liegt ihr Molekulargewicht ebenfalls bei 400.000, was acht Domänen entspricht. Beide Isoformen von NnH zeigen das gleiche Laufverhalten im SDS-Gel, indem nur eine Bande sichtbar ist. Die Heterogenität dieser Bande wurde durch eine Ansequenzierung bestätigt, die in jedem Schritt keine eindeutigen Signale ergab.

Als nächstes sollte geklärt werden, ob sich die Untereinheiten der beiden Isoformen von NnH im nativen Gel unterscheiden lassen. Zum Vergleich wurden die Hämocyanin-Untereinheiten von KLH aufgetragen, das ebenfalls aus zwei verschiedenen Isoformen besteht (**Abb. 26**).

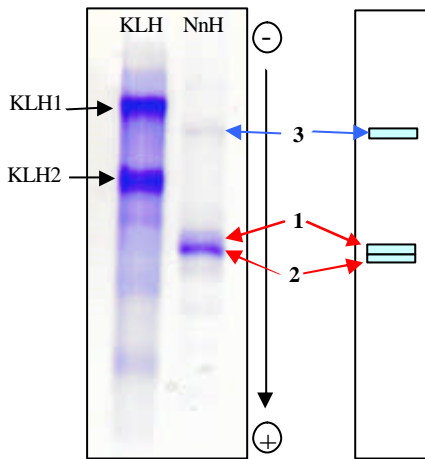


Abb. 26: 5 %ige native PAGE von *Nucula nucleus*-Hämocyanin.

Beide Hämocyanin-Proben wurden in einer Konzentration von 10 µg aufgetragen. Bei KLH sind deutlich zwei Banden zu erkennen, die den beiden Isoformen entsprechen (Markl et al., 1991). Bei NnH tritt deutlich eine starke Bande hervor, die sich nochmals unterteilen lässt (rote Pfeile 1 + 2). Zusätzlich ist schwache Bande zu sehen (blauer Pfeil 3). Die rechts stehende Skizze verdeutlicht die Bezeichnung der Banden.

Im nativen Gel kann man für KLH deutlich zwei Banden unterscheiden, die die beiden Isoformen repräsentieren (Markl et al., 1991; Gebauer et al., 1994). Beim Hämocyanin von *Nucula nucleus* tritt deutlich eine Bande hervor (1 + 2), die sich in einen schwächer gefärbten oberen (1) und einen stärker gefärbten unteren Bereich (2) unterteilen lässt. Im oberen Teil des Gels ist eine schwache Bande (3) zu erkennen. Anschließend wurde ein präparatives Gel angefertigt, aus dem die drei skizzierten Banden getrennt voneinander ausgeschnitten wurden. Nach Elution aus der Gelmatrix wurden diese in einem SDS-Gel aufgetrennt. Banden 2 und 3 entsprachen von der Größe einer Hämocyanin-Untereinheit, wobei in beiden Proben zudem kleinere Abbauprodukte zu sehen waren. Die Molekülmasse von Bande 1 betrug 200 kDa, was auf ein 4-Domänen-Fragment hindeutet. Bande 2 aus der nativen PAGE wurde ansequenziert und erbrachte folgendes Ergebnis:

Bande 2 → L L V R K
 : : : : :
 L L V R K ← NnH1-a

Da NnH1-a mit LLVRK beginnt, handelte es sich bei der stärkeren Bande eindeutig um NnH1.

Um die beiden Isoformen auf ihre immunologischen Unterschiede zu überprüfen, wurde das Hämocyanin von *Nucula nucleus* als Antigen in der Crossed Immunelektrophorese eingesetzt (Abb. 27). Als Antiserum wurde ein Gemisch aus folgenden bereits vorhandenen aus Kanninchen stammende anti-Hämocyanin-Antikörpern eingesetzt: anti-KLH1 (*Megathura crenulata*), anti-KLH2 (*Megathura crenulata*), anti-HtH1 (*Haliotis tuberculata*), anti-HtH2 (*Haliotis tuberculata*), anti-AcH (*Aplysia californica*), anti-RtH (*Rapana thomasiana*) und anti-AfH (*Acanthochiton fascicularis*).

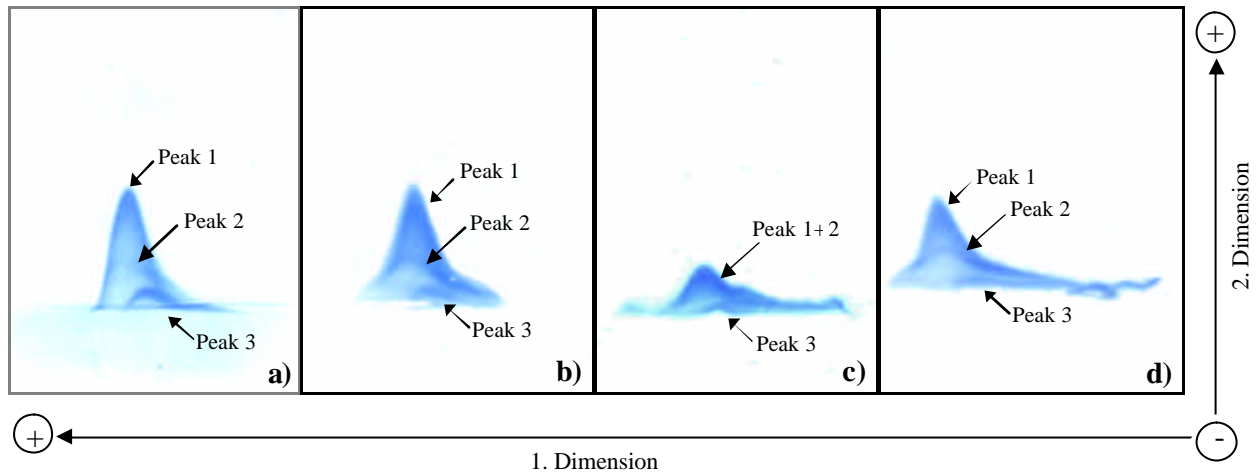


Abb. 27: Crossed-Immunelektrophorese (a) und Crossed-Line-Immunelektrophorese (b + c + d) von NnH.

In der ersten Dimension befand sich die Anode links. Als Antikörper wurde ein Gemisch von Kaninchen-Antikörpern verwendet, die gegen Hämocyane von verschiedenen Mollusken gerichtet sind. a) Als Antigen wurden 6 µg NnH aufgetragen. Dabei wurden drei Gipfel (Peak 1, Peak 2 und Peak 3) präzipitiert. b) In das Loch wurden 8 µg NnH und in den Trog 8µg der isolierten Bande 1 gegeben. Von den drei Präzipitationsgipfeln wurden Peak 1 und Peak 2 schwach angehoben, während Peak 3 stehen blieb. c) In das Loch wurden 8 µg NnH und in den Trog 8 µg der isolierten Bande 2 gegeben. Die schwache Reaktion lag möglicherweise am älteren Material der Antigene. Dennoch war eine schwache Anhebung von Peak 1 und Peak 2 zu erkennen, während Peak 3 stehen blieb. d) In das Loch wurden 8 µg NnH und in den Trog 8 µg der isolierten Bande 3 gegeben. Dabei zeigte sich das gleiche Ergebnis wie in b) und c).

In der Crossed Immunelektrophorese (Abb. 27a) waren drei Präzipitationsgipfel von unterschiedlicher Stärke sichtbar. Um die Gipfel den Isoformen zuordnen zu können, wurden Crossed-Line-Immunelektrophoresen mit den drei isolierten Banden aus der nativen PAGE im Trog durchgeführt (Abb. 27b-d); die als Antigen verwendete NnH-Probe unterlag zu diesem Zeitpunkt allerdings schon einem deutlichen Abbau. Dabei war in der nativen PAGE eine starke Abnahme der Bande 2 zu sehen, dagegen nahmen die Banden 1 und 3 zu. Als Ergebnis der Crossed-Line-Immunelektrophoresen wurden in allen drei Versuchen die Präzipitationsgipfel 1 und 2 angehoben, der Präzipitationsgipfel 3 dagegen nicht. Das lässt vermuten, dass es sich bei allen drei isolierten Banden um NnH1 und Varianten dieser Isoform handelte. Die Stärke der Präzipitationsgipfel spricht für die 4-Domänen-Untereinheit (Bande 1 im nativen Gel) als Peak 1 und die 8-Domänen-Untereinheit (Bande 3 im nativen Gel) als Peak 2, da Peak 1 gegenüber Peak 2 immunologisch unvollständig ist. Präzipitationsgipfel 3 ist vermutlich NnH2, dessen Bande nicht aus dem nativen Gel isoliert wurde. Der kleine Präzipitationsgipfel deutet auf ein geringes Vorkommen dieser Isoform in der Hämocyanin-Probe von *Nucula nucleus* hin. Um das immunologische Muster der einzelnen FUs zu untersuchen, wurde das Hämocyanin von *Nucula*

nucleus über Nacht gegen Glycinpuffer (pH 9,6) dialysiert und anschließend mit Elastase gespalten. Danach wurde es als Antigen in unterschiedlichen Konzentrationen für die Crossed Immunelektrophorese eingesetzt und mit verschiedenen Mengen von anti-Hämocyanin-Antikörper-Gemisch präzipitiert. Leider konnten hierbei keine eindeutigen Peaks detektiert werden, da die Antikörper wahrscheinlich zu wenig spezifisch gegen die Epitope der einzelnen FUs gerichtet waren. Da für weitere Analysen eine Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen das Hämocyanin von *Nucula nucleus* erforderlich gewesen wäre, wurden an dieser Stelle die biochemischen Untersuchungen abgeschlossen.

3. *Nautilus pompilius*-Hämocyanin (NpH)

3.1 Isolierung der Hämocyanin-Klone

Vor Beginn dieser Arbeit lag eine von Herrn Dr. Bernhard Lieb hergestellte genomische Bank vor. Zuerst wurde aus der Mitteldarmdrüse RNA präpariert, da diese als Biosyntheseort für Hämocyanin bereits nachgewiesen worden war (Ruth et al., 1988). Damit konnten unter Verwendung von degenerierten Primern, die aus den konservierten Bereichen der bereits bekannten Hämocyanin-Sequenzen erstellt wurden, *RT*-PCRs durchgeführt. Dabei wurden zwei genomische Teilsequenzen aus *NpH-ab* und *NpH-ef* isoliert. Aus diesen Fragmenten ließ sich anschließend jeweils eine Sonde herstellen, mit Hilfe derer die genomische Bank durchsucht wurde. Die dabei gefundenen Sequenzen konnten durch Vergleich in einem multiplen Alignment den entsprechenden Domänen zugeordnet und daraus NpH-spezifische Primer hergestellt. Um gezielt die Sequenzlücken innerhalb des Gens zu schließen, wurden mittels der Kombination aus spezifischen und degenerierten Primern weitere *RT*-PCR-Reaktionen durchgeführt, die zu weiteren Teilsequenzen führten. Die endständigen Sequenzen wurden durch 5'- und 3'-RACE erhalten. Beim Verknüpfen der verschiedenen Fragmente wurde darauf geachtet, dass eine Überlappung von 200 - 300 bp vorhanden war. Nachdem die komplette cDNA-Sequenz von NpH und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz bekannt war, konnten gezielt Primer zur Überprüfung von internen und Linkerintrons ausgewählt und synthetisiert werden. Für die genomische PCR musste zudem DNA aus Mantelgewebe extrahiert werden.

Abb. 28 zeigt die einzelnen isolierten Klone. Dabei sind nur solche Klone aufgeführt, die zum Zusammensetzen der vollständigen cDNA-Sequenz verwendet wurden. In **Tab. 6** ist die Größe und die Herkunft der Klone vermerkt. Dabei sind genomische Sequenzen, die ein Intron enthalten, mit einem Stern markiert. Der Grund für ihr Auftreten in einer *RT*-PCR ist wie schon bei *Nucula nucleus* mit dem bewussten Verzicht auf einen DNase-Verdau zu erklären.

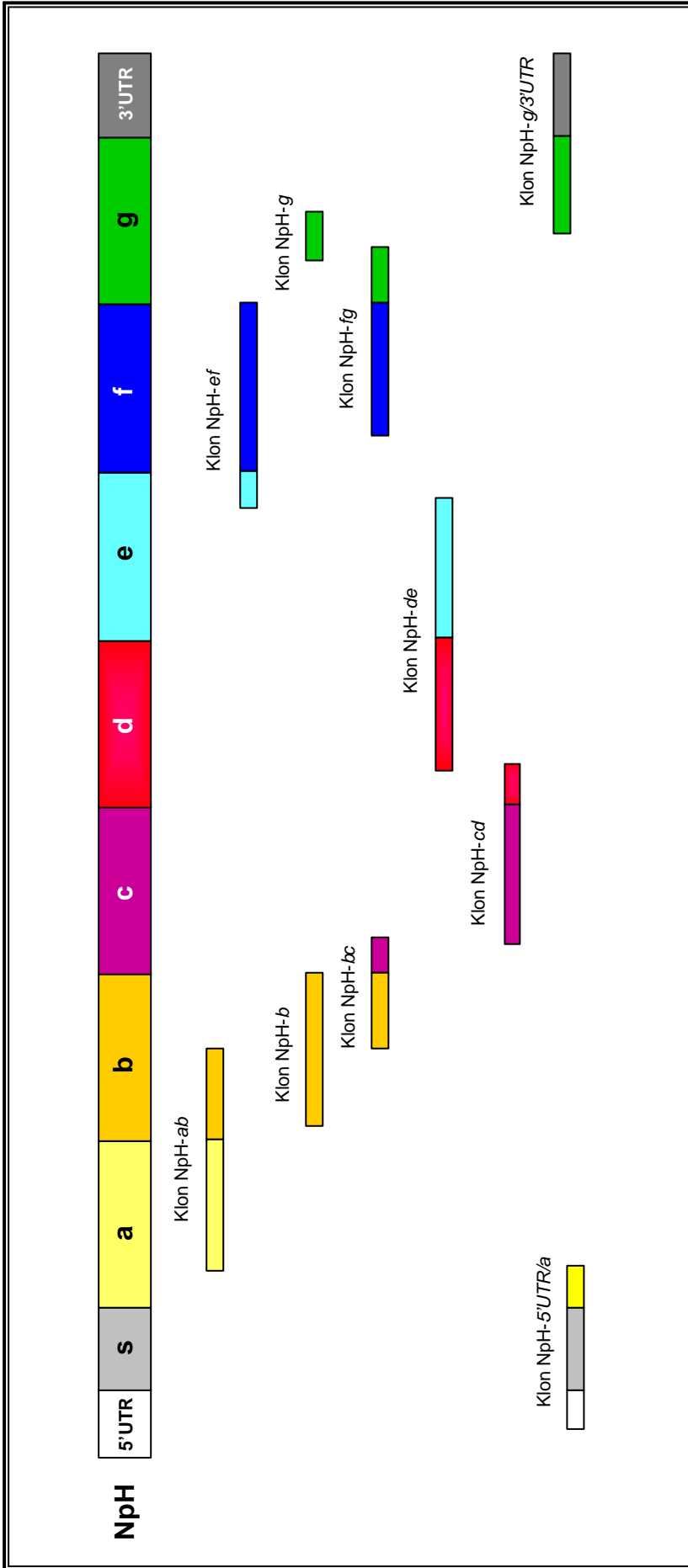


Abb. 28: Für das *Nautilus pompilius* Hämocyanin codierende DNA-Klone.

Die isolierten Klone sind in chronologischer Reihenfolge aufgeführt. Die angegebene Größe entspricht annähernd ihrer tatsächlichen Länge. Die einzelnen FUs sind mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet, dementsprechend auch die Klone.

| Domäne | Größe | Herkunft |
|---------------------|----------|-----------|
| *NpH- <i>ab</i> | ~2160 bp | RT-PCR |
| *NpH- <i>ef</i> | ~2800 bp | RT-PCR |
| NpH- <i>g</i> | ~400 bp | Screening |
| *NpH- <i>b</i> | ~2000 bp | Screening |
| NpH- <i>fg</i> | ~1340 bp | RT-PCR |
| *NpH- <i>bc</i> | ~1200 bp | RT-PCR |
| *NpH- <i>de</i> | ~2500 bp | RT-PCR |
| *NpH- <i>cd</i> | ~2000 bp | RT-PCR |
| NpH- <i>g/3'UTR</i> | ~1000 bp | 3'RACE |
| NpH- <i>5'UTR/a</i> | ~400 bp | 5'RACE |

Tab. 6: Auflistung der isolierten DNA-Klone von *Nautilus pompilius* Hämocyanin.

Die mit Stern markierten Klone sind genomische Fragmente, die mindestens ein Intron enthalten.

- **Sequenz von NpH**

Die vollständige cDNA umfasst 9198 bp und lässt sich in folgende Bereiche unterteilen: Die Sequenz beginnt mit einem 5' untranslatierten Bereich von 58 bp. Daran schließt das Signalpeptid an, welches typisch für Mollusken-Hämocyanin ist (Lieb et al., 2001) und mit dem Startcodon ATG beginnt. Bereits 27 bp zuvor, im untranslatierten Bereich, findet sich ein ATG, welches ebenso das Startcodon sein könnte. Allerdings kommt das weiter vorne liegende ATG eher als Startcodon in Frage. Zum einen weist diese Stelle die Konsensus-Sequenz **PuXXAUGPu** auf (Szczena-Skorupa et al., 1986), die als Initiationspunkt für die Translation bevorzugt wird. Zum anderen stimmt die Länge des Signalpeptids ungefähr mit der bei den anderen sequenzierten Mollusken-Hämocyaninen überein, die bei NpH 21 Aminosäuren beträgt. Wie bereits für andere extrazelluläre Proteine bekannt ist, enthält auch dieses Signalpeptid hauptsächlich hydrophobe Reste. Im Anschluss folgen sieben paraloge Regionen, die den funktionellen Domänen NpH-*a* bis NpH-*g* entsprechen. Diese umfassen 404 - 421 Aminosäuren. Das erste Stopcodon (TAG) befindet sich in der Position 8833 bp, gefolgt von einem 3' UTR von 365 bp. In dieser Region befindet sich auch ein typisches Polyadenylierungssignal (AATAAA), auf das sich 11 bp weiter *downstream* der Poly(A)-Schwanz anschließt.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist in **Abb. 7** aufgeführt und in der EMBL-Datenbank unter der Accession-Nummer AJ 619741 zu finden. Die dazu gehörige Nukleotidsequenz befindet sich im Anhang.



Abb. 29: Abgeleitete Aminosäuresequenz von NpH.

Das Signalpeptid und die einzelnen FUs sind verschieden farbig markiert:
 Signalpeptid NpH-a NpH-b NpH-c NpH-d NpH-e NpH-f NpH-g



3.2 Genomische Analyse

Aus der vollständigen cDNA-Sequenz wurden Primer ausgewählt, um die noch fehlenden genomischen Sequenzen auf ihre Introns zu überprüfen. Die in der PCR entstandenen Fragmente sind in **Abb. 30** aufgeführt.

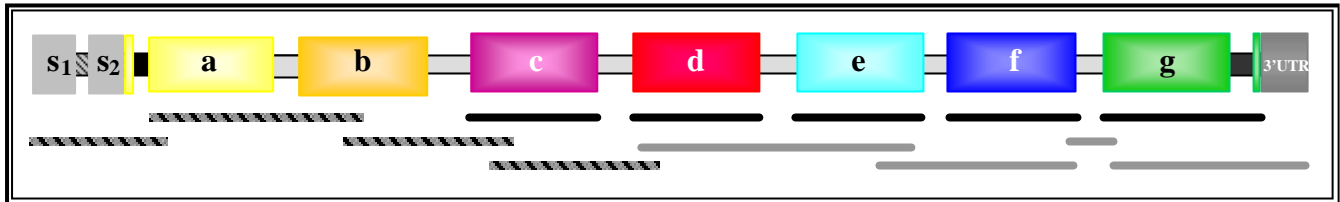


Abb. 30: Isolierte Fragmente der genomischen Analyse des *Nautilus pompilius*-Hämocyanins.

Die Größe der Fragmente symbolisiert annähernd ihre tatsächliche Länge. Schwarz markierte Klone wurden zur Überprüfung der internen Introns ausgewählt, graue Klone für die Analyse der Linkerintrons. Schwarz-grau gestreifte Fragmente dienen zur Analyse beider Intron Typen.

Fragmente, welche die Linkerintrons umfassen, wurden von beiden Seiten ansequenziert, um den genauen Übergang von Exon-Intron zu ermitteln und zudem eine Information über die Phase zu erhalten. Dabei wurde auf die vollständige Sequenzierung der Introns verzichtet, so dass deren Größe zum Teil nur anhand ihrer Laufstrecke im Gel abgeschätzt werden konnte. Insgesamt hat das Gen von NpH etwa eine Länge von 18,5 kb und ist in 10 Exons und 9 Introns untergliedert. Neben den Linkerintrons konnten auch interne Introns identifiziert werden. In **Tab. 7** sind neben dem Intron-Typ auch die Positionen, Phasen und Längen der Introns des für NpH codierenden Gens aufgeführt.

| Domäne | Typ | Position | Länge | Phase |
|------------------------------------|----------|---|----------|-------|
| NpH-s ₁ /s ₂ | „intern“ | CTCTCTGCAG -GT...CAG- CTCCTTGTCT | ~1000 bp | 0 |
| NpH-a ₁ /a ₂ | intern | ACTTCTGACC -GT...TAG- CCACCAATAT | ~5000 bp | 1 |
| NpH-a/b | Linker | TCTTCTGACC -GT...CAG- CACCCATGCG | 487 bp | 1 |
| NpH-b/c | Linker | GTTCCA _g CAC -GT...CAG- ATGTAAAAAG | 277 bp | 1 |
| NpH-c/d | Linker | CCGGCTCTTG -GT...TAG- GTACCTATGG | 487 bp | 1 |
| NpH-d/e | Linker | CCTGCACCAG -GT...CAG- GATCCAAAA | ~600 bp | 1 |
| NpH-e/f | Linker | CCAGCTGCAG -GT...TAG- AACATCACGA | 367 bp | 1 |
| NpH-f/g | Linker | CCAGGAAGAG -GT...CAG- ATACCAAACA | ~300 bp | 1 |
| NpH-g ₁ /g ₂ | intern | CCTGGAAGAG -GT...CAG- GAGCCCAGCA | 819 bp | 1 |

Tab. 7: Position, Länge und Phase der In trons in dem für NpH codierenden Gen.

Das *Splicing* der Introns folgt ausschließlich der GT/AG-Regel. Bis auf das Intron im Signalpeptid liegen alle übrigen in Phase 1 vor, was durch das rot markierte, unterbrochene Codons gekennzeichnet ist.

Ein Intron befindet sich im Signalpeptid, welches als Einziges in Phase 0 vorliegt. Innerhalb der funktionellen Domänen folgt das erste interne Intron vier Aminosäuren *downstream* nach Beginn von NpH-a, das zweite trennt die letzten vier Aminosäuren von NpH-g von der übrigen Domäne ab. Die 3'UTR weist dagegen kein Intron auf, was von den bisher sequenzierten Mollusken-Hämocyanin-Genen abweicht. Die Position der internen Introns ist in **Abb. 31** dargestellt.

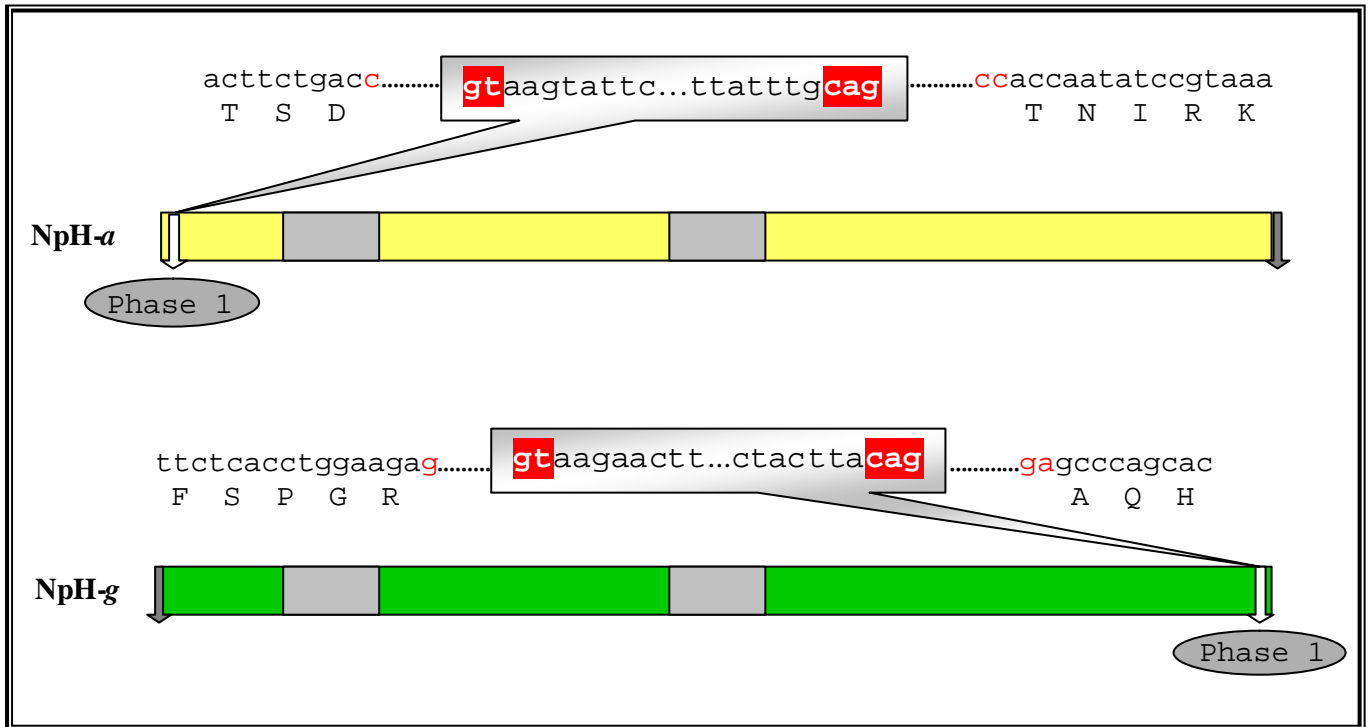


Abb. 31: Interne Introns im Gen des Hämocyanins von *Nautilus pompilius*.

Die FUs sind entsprechend ihrer Zuordnung farbig gekennzeichnet und beide Kupferbindungsstellen grau markiert. Linkerintrons sind mit grauem Pfeil, interne Introns mit weißem Pfeil hervorgehoben. Die die Introns umgebenden Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen sind angegeben, wobei das durch das Intron getrennte Codon rot markiert ist. Anfang und Ende des Introns sind in dem grauen Kasten aufgeführt, wobei die Splice-sites rot unterlegt sind. Die Position der internen Introns wurde annähernd der Lage in der Domäne angepasst.

3.3 Zusätzliche Sequenzdaten

Neben der hier ermittelten vollständigen Sequenz einer Hämocyanin-Polypeptidkette von *Nautilus pompilius*, wurden noch zwei verwandte Sequenzen gefunden, von denen aufgrund von Alignments die eine NpH-a, die andere NpH-f zugeordnet werden konnte. Bei beiden Sequenzen handelt es sich um genomische Fragmente (Abb. 32 und Abb. 33), da sie einen Übergang in den Intronbereich aufweisen.

| | | | | | | |
|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| NpH-a | TNIRKNVADLTHDVALNLQIALRTMQDDNSPIGFQAVAAAYHGEPASCIDSHENLVVCCLH | | | | | |
| | | :: . | | | | |
| ? | TNIRKNVDILTSEETVNLQKALREIQDDHSSNGYQAIAGYHGEPAACSDSLGHPVVCCLH | | | | | |
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| NpH-a | GMPTFPHWHRLYTTHLEQSLALGTTGLPYWDW | | | | | |
| | | | | | | |
| ? | GMPTFPQWHRLYVTQMEQSLISHGATLGFYWDW | | | | | |
| | 70 | 80 | 90 | | | |

Abb. 32: Alignment der Teilsequenz von NpH-a mit der unbekanntem Sequenz.

Diese Sequenz zeigt eine Übereinstimmung von 67 % auf Aminosäureebene und 77,8 % auf Nukleotidebene. Aminosäureaustausche sind rot, stille Mutationen blau markiert.

| | | | | | | |
|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| NpH-f | WAIWQALQQYRRIPYNKAYCALEQMTTHAMKPFDRRETNPKNKTHDHAIPNSVFNYYDDLGY | | | | | |
| | | | | | | |
| ? | WAIWQALQQHRRLLPYNRAYCALEQMSHAMKPFDRRETNPKNKTRDHAIANSVFEEYDDLGY | | | | | |
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| NpH-f | YDNLLFDGLTITELEEKIHSRQSHPRVFAGFLLHAIGTSADVHVSVCHHGNNCTSAGLFF | | | | | |
| | | | | | | |
| ? | YDNLLFDGLTVAELEQEIRNRQSHPRVFAGFLLHAIGTSADVHVSVCHHEESNCTNAGLFF | | | | | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| NpH-f | ILGGKHEMPWKYDRLFRYDITDAVTKAGFSPEDVFNLLYKIHTEINAVNGSHIDSHIM | | | | | |
| | | | | | | |
| ? | ILGGQHEMPWEYDRLFKYDITDAIVQAGFTPEAVFDDKMPFKIHMKISAVNGSHIDSRII | | | | | |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| NpH-f | HEPTLIFVPGR | | | | | |
| | | | | | | |
| ? | HEPTLIFVPGR | | | | | |
| | 190 | | | | | |

Abb. 33: Alignment der Teilsequenz von NpH-f mit der unbekanntem Sequenz.

Diese Sequenz zeigt eine Übereinstimmung von 82,2 % auf Aminosäureebene und 88,2 % auf Nukleotidebene. Aminosäureaustausche sind rot, stille Mutationen blau markiert.

| | | | | | | | |
|-------|---|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | |
| NpH-d | ASRIRKDLNTLTDGELESLRNAFLRLQEEGAYEPIAAFHGVPKCRGEDGNIYTCCVHGM | | | | | | |
| | | | | | | | |
| NmH-d | ASRIRKDLNTLTDGELESLRNAFLRLQEEGAYEPIAAFHGVPKCRGEDGNIYTCCVHGM | | | | | | |
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | |
| NpH-d | PTFPHWHRLYV IQVEHALRERGS GVSVPYWDWTKRFNHL PALMDESTFYNSRKNE MNTPN | | | | | | |
| | | | | | | | |
| NmH-d | PTFPHWHRLYV IQVEHALRERGS GVSVPYWDWTKRFNHL PEL IDESTFYNSRKNE MNTPN | | | | | | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| NpH-d | FHRGSISFINSHTSRDFQPELFNSDYLYENTLLALEQNDFCNFEVQLEVLHNAIHAWIGG | | | | | | |
| | | | | | | | |
| NmH-d | FHRGSISFINSHTSRDFQPELFNSDYLYENTLLALEQNDFCNFEVQLEVLHNAIHAWIGG | | | | | | |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | |
| NpH-d | RDTYSMSSLDYAAYPDPIFFIHHSTLDRIWAIWQELQRYRGLPYNEANCALPLMNQHLRPF | | | | | | |
| | | | | | | | |
| NmH-d | RDTYSMSSLDYAAYPDPIFFIHHSTLDRIWAIWQELQRYRGLPYNEANCALPLMNQHLRPF | | | | | | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| NpH-d | NNVSVNHDRNTLTLNKPNDADFYQNHFHRYDNLDFHGLSIPQLEHELHERQTHDRV FVG | | | | | | |
| | | | | | | | |
| NmH-d | NNVSVNHDRNTLTLNRPNDADFYQNHFHRYDNLDFHGLSIPQLEHELHERQTHDRV FVG | | | | | | |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | |
| NpH-d | FLLHGIQASAYVRIYICVPTQRGSSKENCNNYAGIFSILGGVTEMPWHFDRLYYYEITHA | | | | | | |
| | | | | | | | |
| NmH-d | FLLHGIQASANVRIYICVPTQRGSSKENCNNYAGIFSILGGVTEMPWHFDRLYYYEITHA | | | | | | |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | |
| | 370 | 380 | 390 | | | | |
| NpH-d | LSNLGLSHRSHFRIKTDINAVNGTHFDSHI | | | | | | |
| | | | | | | | |
| NmH-d | LSNLGLSHRSHFRIKTDINAVNGTHFDSHF | | | | | | |
| | 370 | 380 | 390 | | | | |

(a)

| Stille Mutationen | | Aminosäureaustausch | |
|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Aminosäure | Nukleotidaustausch | Aminosäureaustausch | Nukleotidaustausch |
| I | ATT → ATC | A → E | GCA → GAA |
| G | GGG → GGA | M → I | ATG → ATA |
| L | TTA → CTA | K → R | AAG → AGG |
| P | CCA → CCG | Y → N | TAT → AAT |
| N | AAT → AAC | I → F | ATC → TTC |

(b)

Abb. 35: Vergleich einer Teilsequenz aus FU-d zwischen *N. pompilius*- und *N. macromphalus*-Hämocyanin.

(a) Die beiden Arten zeigen eine Übereinstimmung von 98,5 % auf Aminosäureebene und 98,6 % auf Nukleotidebene. Aminosäureaustausche sind rot, stille Mutationen blau markiert. (b) Nukleotidaustausche in den Codons, die zu einer stillen Mutation bzw. zu dem Aminosäureaustausch führten.

3.5 Biochemische Untersuchungen

Um das Hämocyanin von *Nautilus pompilius* auch biochemisch und immunologisch zu charakterisieren, wurden native und SDS-Gele angefertigt. Zudem wurde NpH mittels Immunelektrophorese untersucht, wofür auch unterschiedliche Spaltungen des Hämocyanins mit Proteasen zum Einsatz kamen.

Von der Arbeitsgruppe Prof. Schipp aus Gießen wurde frisch gezapfte Hämolymphe zur Verfügung gestellt und das Hämocyanin über Ultrazentrifugation gereinigt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass das Hämocyanin ausschließlich in Form von Dekameren vorliegt (Abb. 36). Dies stimmt mit der Literatur überein (Bonaventura et al., 1981; Chignell et al., 1997).

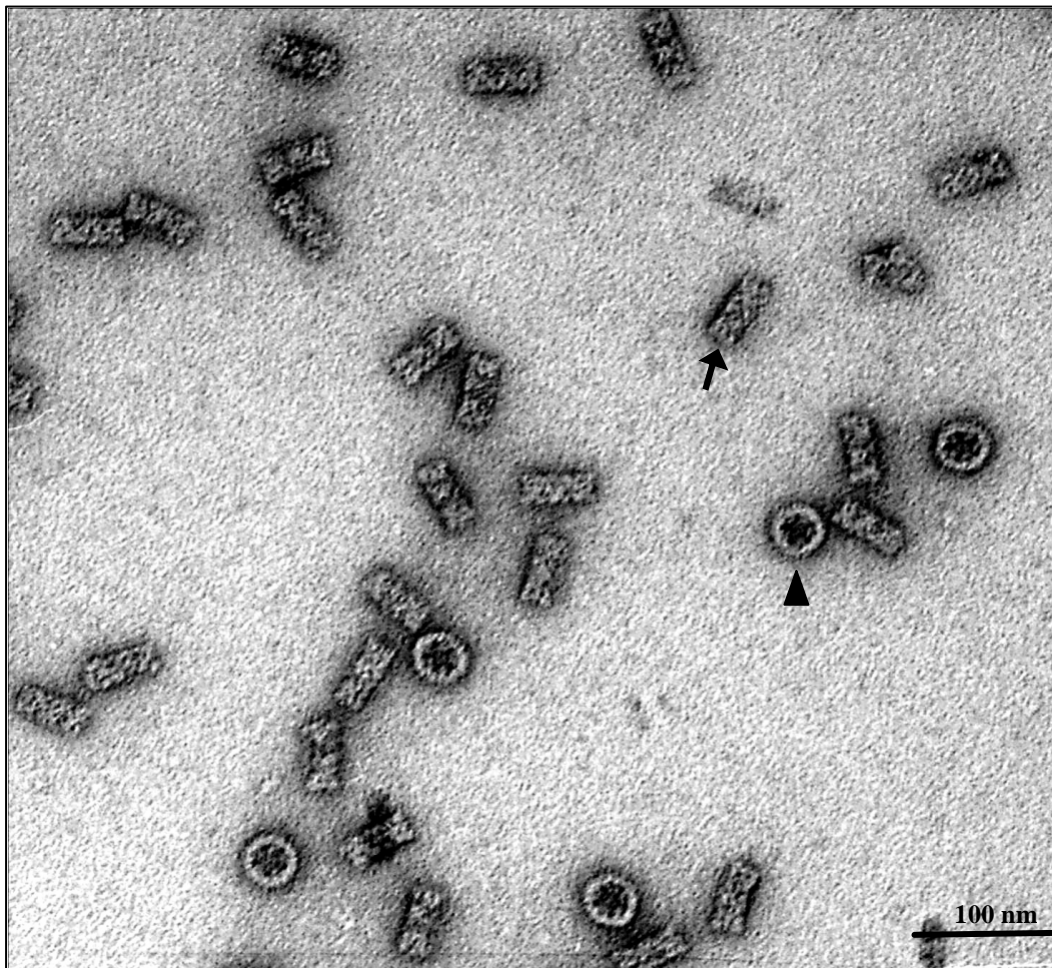


Abb. 36: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Nautilus pompilius*-Hämocyanin.

NpH liegt ausschließlich in Form von Dekameren vor, die in Aufsicht (Pfeilspitze) und Seitenansicht (Pfeil) hier zu sehen sind. Negativkontrastierung mit 2 % Uranylacetat.

Denaturierung mit SDS und anschließende Auftrennung im Polyacrylamid-Gel zeigt ein schnelleres Laufverhalten des NpH im Vergleich zum Gastropoden-Hämocyanin (**Abb. 37**).

Um die Größe abzuschätzen, wurde das Hämocyanin von *Megathura crenulata* (KLH1/KLH2) als auch das von *Rapana thomasiana* (RtH1/RtH2) als Vergleich aufgetragen, welches bei beiden Organismen aus acht Domänen besteht.

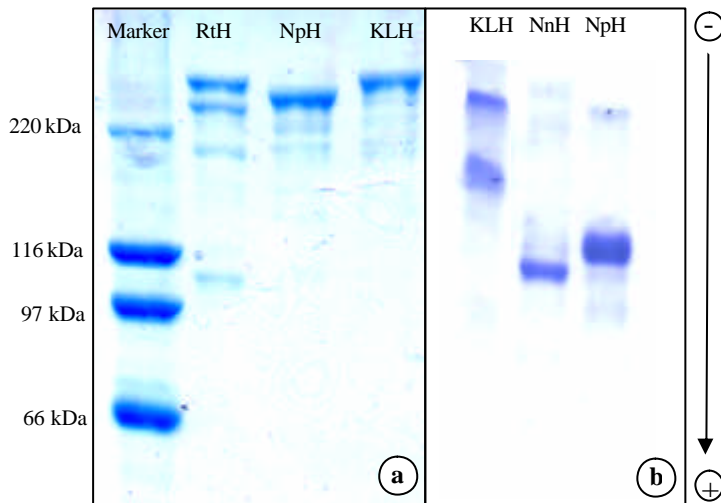


Abb. 37: SDS-PAGE (7,5 %iges Gel) (a) und native PAGE (5 %iges Gel) (b) der Untereinheit von *Nautilus pompilius*-Hämocyanin.

Die Proben wurden in einer Konzentration von 5 µg eingesetzt. a) Neben dem Marker sind die Hämocyanine von *Rapana thomasiana* (RtH) und *Megathura crenulata* (KLH) als Vergleich aufgetragen. NpH läuft unterhalb der 400 kDa-Banden der Gastropoden-Hämocyanine, allerdings liegt es über dem 6-Domänen-Fragment von RtH2 (300 kDa). Daher wird die Molekülmasse auf 350 kDa geschätzt, was sieben Domänen entspricht. b) Zum Vergleich wurden KLH und NnH aufgetragen. Nur bei KLH zeichnen sich die beiden Isoformen als zwei Banden ab, während bei NnH und NpH nur eine Bande zu sehen ist.

Das Laufverhalten der Untereinheiten der beiden Isoformen von KLH und RtH in der SDS-PAGE wurde bereits in Kapitel C 2.3 beschrieben. Da sich die Bande von NpH zwischen dem 6-Domänen-Fragment von RtH2 (300 kDa) und den 8-Domänen-Fragmenten von KLH1, KLH2 und RtH1 (400 kDa) befindet, liegt die Größe ungefähr bei 350 kDa, was den sieben Domänen entspricht (Bonaventura et al., 1981).

Im nativen Gel läuft NpH als eine Bande, während bei KLH deutlich zwei Banden zu sehen sind, die den beiden Isoformen entsprechen. Das Laufverhalten von NnH wurde bereits unter Kapitel 2.3 erläutert.

Gereinigtes und dissoziiertes Hämocyanin wurde dazu verwendet, polyklonale Antikörper in Kaninchen herstellen zu lassen. Diese wurden zur Präzipitation des NpH in der Crossed Immunelektrophorese eingesetzt (**Abb. 38**). Zum einen wurde dissoziiertes NpH als Antigen

verwendet, um das Vorhandensein von mehr als einer Form zu überprüfen. Dabei zeigte sich jedoch nur ein einzelner Peak, der für ein einziges Polypeptid oder aber für immunologisch nicht unterscheidbare und damit nahezu identische Isoformen spricht.

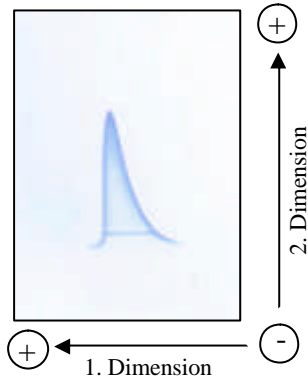


Abb. 38: Crossed-Immunelektrophorese der NpH-Untereinheit.

Als Antigen wurde 4 µg NpH eingesetzt, das mit spezifischen Kaninchen-Antikörpern gegen *Nautilus pompilius*-Hämocyanin präzipitiert wurde. In der ersten Dimension war die Anode auf der linken Seite.

Um dies genauer zu analysieren, wurde die Hämocyanin-Untereinheit einer limitierten Spaltung mit Elastase unterzogen. Elastase spaltet Hämocyanin unter schonenden Bedingungen normalerweise zwischen den funktionellen Domänen. Der Elastase-Verdau wurde in einem SDS-Gel auf seine Spaltprodukte hin überprüft (Abb. 39) und gleichzeitig als Antigen in der Crossed Immunelektrophorese aufgetragen (Abb. 40).

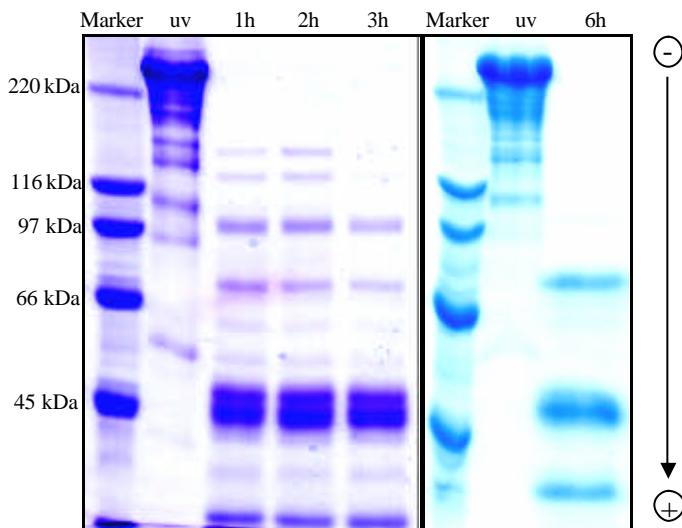


Abb. 39: 7,5 %ige SDS-PAGE des Elastase-Verdau des NpH.

Der Verdau des in die Untereinheit dissoziierten NpH wurde bei 37 °C durchgeführt und nach verschiedenen Zeiten abgestoppt. Zum Vergleich ist die unverdaute Probe (uv) aufgetragen. Ein Großteil der Hämocyanin-Untereinheit wurde bereits innerhalb der ersten Stunde gespalten in Domänen gespalten. Nach 3 h war neben den vereinzelt Domänen bei ca. 50 kDa auch ein 2-Domänen-Fragment (~ 100 kDa) zu sehen. Zudem trat eine Bande bei etwa 70 kDa und eine bei 30 kDa auf, die beide auch nach einem sechsstündigen Verdau noch vorhanden waren.

Vergleicht man die Hämocyanin-Probe vor und nach der Spaltung, so ist bereits nach einer Stunde ein Großteil der Hämocyanin-Untereinheit in Domänen gespalten. Nach dieser Zeit treten keine Fragmente größer als 150 kDa auf, was einem 3-Domänen-Fragment entspricht. Nach 3 h lag neben den einzelnen FUs bei etwa 50 kDa auch ein 2-Domänen-Fragment (~ 100 kDa) vor. Zusätzlich sind eine Bande bei ca. 70 kDa und eine bei 30 kDa zu sehen, die beide auch nach einer sechsstündigen Spaltung noch vorhanden waren.

Im immunoelektrophoretischen Muster waren sieben Peaks zu sehen (**Abb. 40**). Von diesen traten drei Gipfel deutlich separiert voneinander hervor (Pfeile 5,6 und 7), während jeweils zwei der restlichen vier Peaks eine immunologische Verwandtschaft zeigten (Pfeile 1 + 2 und 3 + 4). Außerdem ist ein sehr schwacher Gipfel zu erkennen (Pfeilspitze).

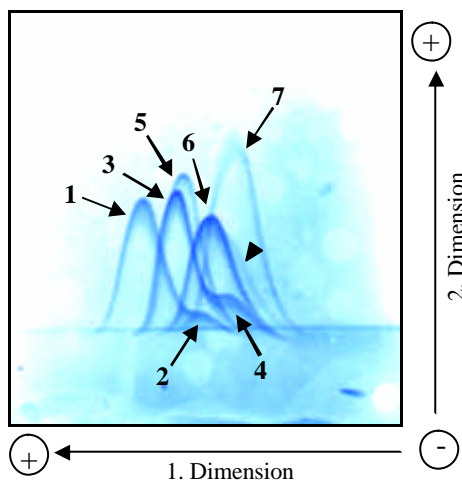


Abb. 40: Crossed Immunelektrophorese der mit Elastase limitiert gespaltenen NpH-Untereinheit.

Hierbei sind sieben Peaks zu erkennen (Pfeil 1 - 7), von denen drei deutlich als einzelne Gipfel hervortreten. Von den anderen vier Peaks zeigen jeweils zwei eine immunologische Verwandtschaft. Zudem ist ein schwacher Schatten eines Gipfels zu erkennen, der hier durch eine Pfeilspitze markiert ist.

Um die Peaks den entsprechenden Domänen zuordnen zu können, wurde versucht, einzelne von ihnen zu isolieren. Dazu wurde zuerst getestet, welche Proteasen sich zur Spaltung des Hämocyanins in der Weise eignen, dass sie Fragmente aus mehreren Domänen hervorbringen (**Abb. 41**). Dabei lieferte die V8-Protease und das Trypsin das beste Ergebnis, während Papain und Chymotrypsin sich als ungeeignet erwiesen.

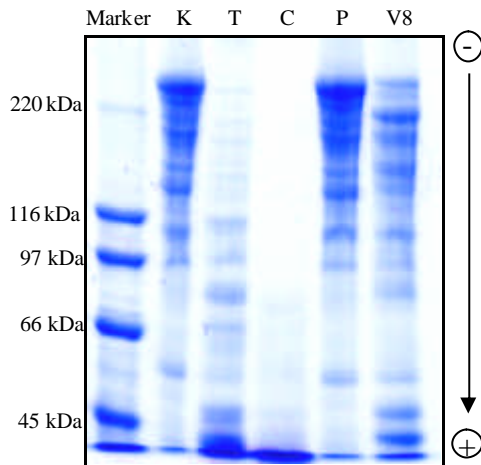


Abb. 41: *Nautilus pompilius*-Hämocyanin vor und nach der Spaltung mit verschiedenen Proteasen (7,5 %iges SDS-Gel).

Der Verdau wurde bei allen Ansätzen für 3 h durchgeführt. Die Spur K bezeichnet die unverdaute Probe (Kontrolle). Diese zeigt allerdings schon einen deutlichen Zerfall in kleinere Fragmente. Die Spaltung mit Trypsin (T) lieferte, ebenso wie die V8-Protease, Fragmentgrößen über den gesamten Trennbereich. Dabei dominierten bei Trypsin im Gegensatz zur V8-Protease Fragmente, die kleiner als 116 kDa sind. Chymotrypsin (C) dagegen verdaute das Hämocyanin fast vollständig, während Papain (P) keinen Unterschied zu der unverdauten Probe zeigte.

Als erstes wurde mit der V8-Protease gespalten und die Spaltprodukte mittels Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt. Das Elutionsprofil zeigte drei verschiedene Peaks, die anschließend im SDS-Gel auf ihre Größe untersucht wurden (**Abb. 42**). Bei Peak 1 (Fraktion 15) und Peak 2 (Fraktion 21) handelte es sich um Fragmente, deren Größe der von einer Domäne entspricht. Der dritte Peak wurde dagegen nicht im Gel aufgetrennt, sondern blieb in den Taschen. Material aus den ersten beiden Peaks wurde in den Trog der Crossed-Line-Immunelektrophorese gegeben, mit einem Elastase-Verdau im Loch. Dabei wurde jeweils ein anderer Peak angehoben. Beide Fragmente wurden danach in einem SDS-Gel aufgetrennt, dieses auf eine PVDF-Membran geblottet, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und zum Sequenzieren geschickt. Die Fraktionen des dritten Peaks aus der Anionenaustauschchromatographie wurden vereinigt, mit Centricon-Säulen eingengt und anschließend mit Trypsin verdaut. Dieser Verdau wurde wiederum auf die Anionenaustauschersäule aufgetragen, wobei vier verschiedene Peaks aufgetrennt wurden. Im Gel zeigten die einzelnen Fraktionen Banden von etwa 50 kDa, wobei nur in einer Fraktion (Fraktion 30) eine Bande vereinzelt vorlag (**Abb. 42**). Mit dieser wurde ebenfalls eine Crossed-Line-Immunelektrophorese durchgeführt, bei der ein weiterer unbekannter Peak angehoben wurde. Die vom Gel auf die PVDF-geblottete Bande wurde zum Sequenzieren geschickt. Die Sequenzierungen erbrachten die in **Abb. 42** gezeigten Ergebnisse:

| PROBE | SEQUENZ | SDS-PAGE | IMMUNGEL |
|---------------------------------|--|----------|----------|
| <p>Fraktion 30</p> <p>NpH-c</p> | <pre> S M N I S H : : : : : V K S M N I S H </pre> | | |
| <p>Fraktion 15</p> <p>NpH-f</p> | <pre> V H H P L N : : : : : E H H E V H H P L N </pre> | | |
| <p>Fraktion 21</p> <p>NpH-g</p> | <pre> E I S G G . : : : : N T K Q A E R E R R I S G G </pre> | | |

Abb. 42: Zur Domänenstruktur des NpH: Identifizierung von NpH-c, NpH-f und NpH-g.

Aufgeführt sind die Proben und deren durch Proteinsequenzierung erhaltenen Sequenz im Vergleich zu der aus der DNA-Sequenzierung abgeleiteten Sequenz. Zusätzlich ist jeweils das SDS-Gel mit dem dazugehörigen Immungel abgebildet. Damit waren drei der Präzipitationsgipfel identifiziert.

Um weitere Präzipitationsgipfel den entsprechenden Domänen zuordnen zu können, wurde dissoziiertes *Nautilus*-Hämocyanin für 4 h mit 2 % Trypsin gespalten. Dieser Verdau wurde auf die Anionenaustauschersäule aufgetragen. Das Elutionsprofil zeigte neun Peaks, deren Fraktionen im SDS-Gel untersucht wurden (**Abb. 43**). Da keiner der Peaks vereinzelte Banden enthielt, wurden die zu untersuchenden Fraktionen im nativen Gel auf ihr Laufverhalten überprüft. Hierbei konnten einzelne Banden aufgetrennt werden, die mittels einer semipräparativen PAGE aus dem Gel herausgeschnitten wurden. Sie wurden einzeln in

den Trog gegeben, wobei neben den bekannten Gipfeln NpH-c, NpH-f und NpH-g auch ein bisher nicht identifizierter Peak angehoben wurde. Diese Bande (Bande 8/Fraktion 36) wurde nochmals einer SDS-PAGE unterzogen, geblottet und zum Sequenzieren weggeschickt. Die Sequenzierung lieferte das in **Abb. 43** gezeigte Ergebnis:

| PROBE | SEQUENZ | SDS-PAGE | IMMUNGEL |
|---------------------------------|--|----------|----------|
| <p>Fraktion 36</p> <p>NpH-a</p> | <p>T S D P T N</p> <p>: : : : : :</p> <p>T S D P T N</p> | | |

Abb. 43: Identifizierung von NpH-a.

Gezeigt ist die Probe und deren durch Proteinsequenzierung erhaltene Sequenz im Vergleich zu der aus der DNA-Sequenzierung abgeleiteten Proteinsequenz. Siehe Legende Abb.42.

Als nächstes wurde das *Nautilus pompilius*-Hämocyanin mit Pepsin und *Astacus*-Protease verdaut. Mit Pepsin erfolgte keine Spaltung des Hämocyanins in kleinere Fragmente, weshalb diese Protease nicht weiter verwendet wurde. Eine sechsstündige Spaltung mit *Astacus* Protease lieferte Fragmente, die im Bereich von 50 kDa bis über 200 kDa lagen, wobei 4-Domänen-Fragmente und 3-Domänen-Fragmente überwogen. Eine Anionenaustauscherchromatographie und anschließende SDS-PAGE der Fraktionen zeigte allerdings, dass die verschiedenen Domänen-Fragmente nicht vereinzelt werden konnten. Fraktionen, in denen ein Monodomänen-Fragment überwog, wurden mittels Crossed-Line-Immunelektrophorese überprüft; es stellte sich als NpH-c heraus. Die Fraktionen, die im Gel größere Fragmente zeigten, wurden gepoolt und über Gelfiltration aufgetrennt. Das Elutionsprofil zeigte zwei Peaks, von denen der kleinere das Monodomänen-Fragment NpH-a enthielt. Der große Peak enthielt die übrigen Fragmentgrößen, die in der Crossed-Line-Immunelektrophorese alle Gipfel außer NpH-c und NpH-a anhoben. Um die in dem großen Peak enthaltenen Fragmente in kleinere Spaltprodukte zu zerlegen, wurde die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration mit der V8-Protease gespalten. Daraus resultierten Fragmente, deren Banden im Gel eine Größe von zwei Monodomänen-Fragmenten, einem 2-Domänen-Fragment und einem 3-Domänen-Fragment aufwiesen. Diese Mischung wurde auf die

Anionenaustauschersäule aufgetragen, wobei vier Peaks eluiert wurden. Diese wurden in der SDS-PAGE und in der Crossed-Line-Immunelektrophorese überprüft. Die ersten drei Peaks enthielten vereinzelte Monodomänen-Fragmente, nämlich NpH-f bei Peak 1 und 2 und NpH-g bei Peak 3. In dem letzten Gipfel war neben Spuren der beiden letztgenannten Fragmente als Hauptbande das 2-Domänen-Fragment und etwas schwächer das 3-Domänen-Fragment zu sehen. In der Immunelektrophorese wurde allerdings neben NpH-f und NpH-g nur ein weiterer Peak angehoben. Um das 2-Domänen-Fragment und das 3-Domänen-Fragment in Monodomänen-Fragmente zu spalten, wurde diese Probe für 3 h mit Elastase gespalten (**Abb. 44**). Da die Überprüfung im SDS-Gel weiterhin das 2-Domänen-Fragment zeigte, wurde die Spaltung nochmals für 3 bzw. 6 weitere Stunden angesetzt, wobei eine erneute Zugabe von Elastase erfolgte. Doch auch diese Versuche führten zu keinem weiteren Verdau.

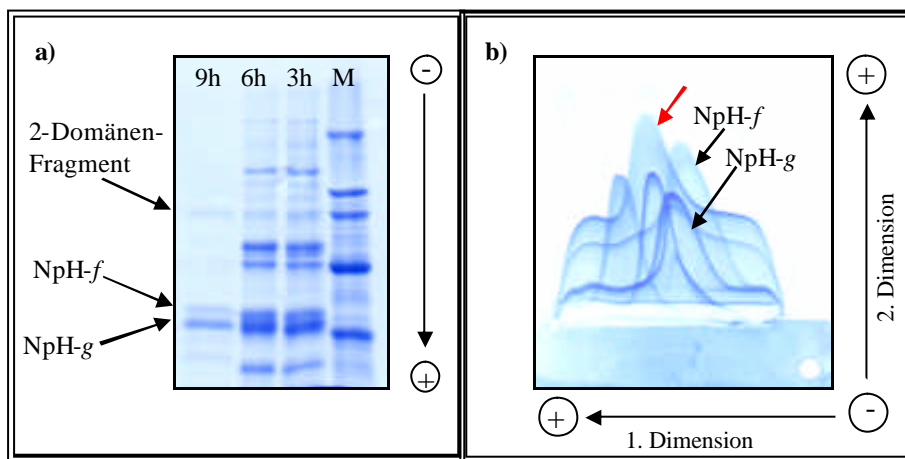


Abb. 44: Elastase-Spaltung des vierten Peaks der Anionenaustauschchromatographie und die dazugehörige Crossed-Line-Immunelektrophorese.

a) Wie die mehrstündige Elastase-Spaltung (3 h bis 9 h) zeigt, bleibt neben den Monodomänen-Fragmenten von NpH-f und NpH-g das 2-Domänen-Fragment bestehen. b) Der neunstündige Verdau wurde in den Trog der Crossed-Line-Immunelektrophorese gegeben. Neben den bereits bekannten Peaks von NpH-f und NpH-g wurde nur ein weiterer Gipfel (roter Pfeil) angehoben.

Um zu klären, welche Domänen dem 2-Domänen-Fragment entsprechen, wurde die Probe auf eine PVDF-Membran geblottet und die entsprechende Bande zum Sequenzieren geschickt. Leider war dabei keine eindeutige Sequenz ablesbar, was möglicherweise die Folge eines blockierten oder modifizierten N-Terminus sein könnte. Aus diesem Grund wurde ein tryptischer Verdau des 2-Domänen-Fragments durchgeführt und die generierten Peptide anschließend über die HPLC getrennt. Leider blieb die Ansequenzierung erfolglos.

In **Abb. 45** sind die Spaltungen und deren Produkte zusammengefasst.

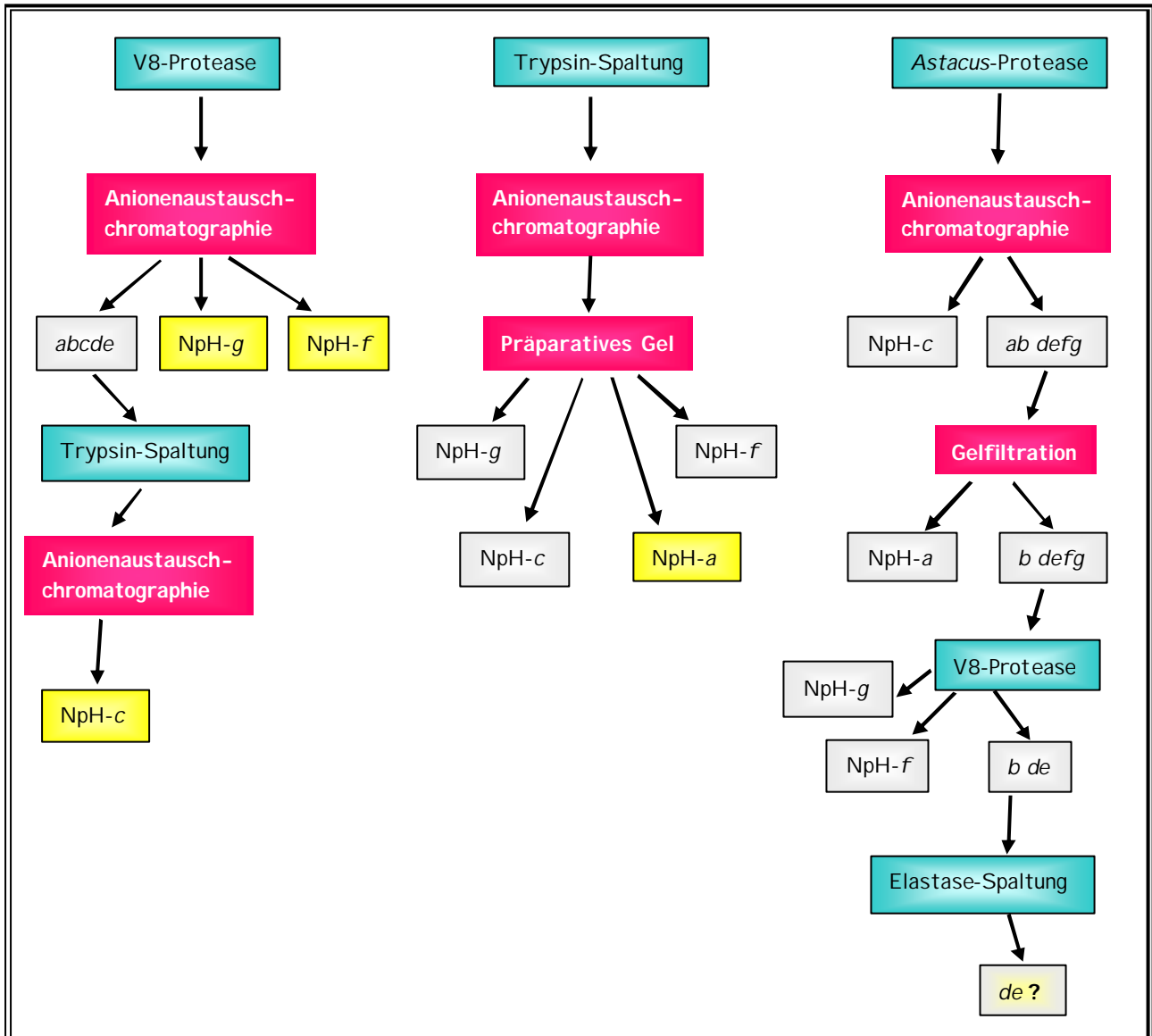


Abb. 45: Übersicht über die Protease-Spaltungen, deren Aufreinigung und deren Spaltprodukte.

Isolierte und identifizierte FUs sind gelb unterlegt. Grau unterlegte Spaltprodukte waren entweder schon bekannt oder konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Das grau-gelb markierte Didomänen-Fragment *de* wurde mit einem Fragezeichen versehen, da die Zuordnung nur anhand Ausschluss der anderen FUs erfolgte und daher noch überprüft werden muss. Zu klären wäre ebenso die Identifizierung von NpH-*b*.

4. Lektin-Bindungstest

Dieser Test wurde sowohl mit *Nucula nucleus*-Hämocyanin als auch mit *Nautilus pompilius*-Hämocyanin durchgeführt. Wie aus der Sequenz abzulesen ist, enthält NpH etwa viermal so viele potentielle N-glykosidische Bindungsstellen wie NnH. Um diese Beobachtung direkt über das Vorhandensein von Zuckerresten nachzuprüfen, wurde ein Lektin-Test durchgeführt. Dazu wurde ein Lektin von *Triticum vulgare* verwendet, das N-Acetylglucosamin-Reste erkennt (**Abb. 46**). Als Negativkontrolle wurde das Intermediärfilament Vimentin eingesetzt.

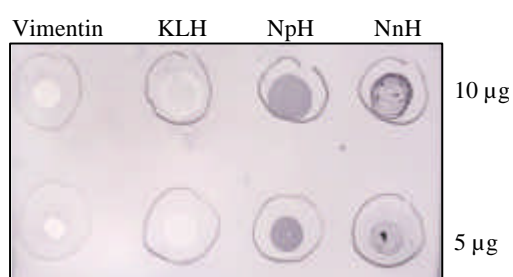


Abb. 46: Überprüfung von N-glykosidisch gebundenen Zuckern mit Hilfe von Lektin.

Nautilus pompilius-Hämocyanin (NpH) und *Nucula nucleus*-Hämocyanin (NnH) wurden in einer Konzentration von 5 µg und 10 µg eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde Vimentin, als Vergleich KLH verwendet, ebenfalls 5 µg und 10 µg. Zur Blockierung wurde die Membran mit 2 %iger BSA-TBS-Lösung inkubiert.

Aus dem Versuch geht deutlich hervor, dass am Hämocyanin von *Nucula nucleus* weniger Lektin gebunden wurde als an dem von *Nautilus pompilius*. Die Intensität der Färbung entspricht ungefähr dem ungleichen Verhältnis an N-glykosidischen Bindungsstellen bei den beiden Organismen. Das Hämocyanin von *Megathura crenulata* weist trotz zahlreicher potentieller N-glykosidischer Bindungsstellen in der Sequenz die schwächste Färbung auf. Zudem zeigte sich, dass sich Vimentin mit seiner Negativfärbung gut als Negativkontrolle eignet.

D Diskussion

1. *Warum Hämocyanin?*

Das Hämocyanin der Mollusken gehört seit längerem zu einem der thematischen Schwerpunkte unserer Arbeitsgruppe. Dieses Molekül beeindruckt nicht nur durch seine Größe, sondern bietet auch ein vielfältiges Spektrum an Untersuchungsmöglichkeiten. Dabei war zu Beginn der Forschungsarbeit vor allem das Hämocyanin der Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* (KLH) von besonderem Interesse, dessen immunstimulatorische Eigenschaften seit mehr als 30 Jahren bekannt sind (Harris & Markl, 1999). Neben seiner klinischen Verwendung als Hapten-Carrier wird es zur Behandlung von Harnblasenkarzinomen eingesetzt (Harris & Markl, 1999; Linn et al., 2000). Zudem wurde nachgewiesen, dass der Erreger der Bilharziose, *Schistosoma mansoni*, Hämocyanin-typische Oberflächenstrukturen aufweist, die mit KLH-spezifischen Antikörpern kreuzreagieren (Grzych et al., 1987; Harris & Markl, 1999). Diese Antikörper werden daher zur Diagnose der Tropenkrankheit eingesetzt (Alves-Brito et al., 1992; Lambertucci, 1993). Doch nicht nur die medizinischen Aspekte des Hämocyanins erweisen sich als interessant, sondern auch Untersuchungen an dessen Aufbau von Quartär- bis hin zur Primärstruktur treten immer mehr in den Vordergrund. Vor allem das Hämocyanin-Gen liefert allein aufgrund seiner Größe sehr viel Sequenzinformation. Der Aufbau der funktionellen Domänen stellt eine gute Basis dar, um phylogenetische Analysen durchzuführen. Diese zeichnen sich einerseits durch wiederkehrende, konservierte Sequenzmerkmale aus, anhand derer sich die Sequenzen untereinander zuordnen lassen. Andererseits gibt es außerhalb der Kupferbindungsstellen variable Bereiche, dessen Sequenzunterschiede als Evolutionsmarker genutzt werden. Daher liegt ein Fokus auf der Sequenzierung der Hämocyanine verschiedener Taxa, anhand derer man sich einen Einblick in deren Phylogenie erhofft.

2. *Quartärstrukturen und biochemische Untersuchungen*

2.1 *Nucula nucleus*

Das native Hämocyanin von *Nucula nucleus* liegt hauptsächlich als Didekamer vor (siehe **Abb. 24**), was zu Untersuchungen an der eng verwandten Art *Nucula hanleyi* passt (Lambert et al., 1995b). Zusätzlich treten vereinzelt Tridekamere auf, die durch Assoziation eines Didekamers mit einem Dekamer zustande kommen. Die Dekamere, die ebenfalls zu einem geringen Anteil in der elektronenmikroskopischen Aufnahme sichtbar waren, waren

möglicherweise eine Folge der Aufreinigung. Eine Instabilität der Didekamere wurde bereits bei KLH2 beobachtet (Harris & Markl, 2000). Die Quartärstruktur des Hämocyanins von *Nucula nucleus* gleicht damit eher der Situation in Gastropoden, während Cephalopoden und Chitonen nur Dekamere besitzen. Somit stellt sich die Frage, wovon die Bildung von Didekamern abhängt bzw. durch was sie verhindert wird. Die Vermutung, dass die Assoziation durch die fehlende achte Domäne bei einem Teil der Cephalopoden nicht möglich ist, wird durch das Vorhandensein von acht funktionellen Domänen bei *Sepia officinalis* und den Chitonen relativiert (Gielens et al., 1983; Lambert et al., 1995a). Ebenso wird der Einfluss N-glykosidisch gebundener Zucker diskutiert, wobei die bei Schnecken- und Muschel-Hämocyanin übereinstimmenden Bindungsstellen auch bei den anderen Organismen auftreten; Daten für einen Vergleich der Zuckerbäume liegen allerdings noch nicht vor. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die Art der Assemblierung innerhalb der Mollusken-Klassen einheitlich ist. Geht man von einer ursprünglichen Quartärstruktur des Hämocyanins aus - d.h. entweder Dekamer oder Didekamer – dann müsste der Verlust bzw. der Erwerb der Komplexbildung nach der Auftrennung in die Klassen, aber vor Entstehung der Ordnungen erfolgt sein.

Der Größenvergleich zwischen den Hämocyaninen von *Rapana thomasiana*, *Haliothis tuberculata* und *Nucula nucleus* in der SDS-PAGE spiegelt den ähnlichen Aufbau einer Hämocyanin-Untereinheit von Gastropoden und Bivalviern wieder (siehe **Abb. 25**). Dies spricht für ein Molekulargewicht des Didekamers um $8,0 \times 10^6$, das von Terwilliger et al. (1988) und Herskovits et al. (1990) gefunden wurde. Dagegen wurde von Mangum et al. (1987) bei der protobranchiaten Muschel *Yoldia limulata* ein Molekulargewicht von $6,5 - 6,8 \times 10^6$ bestimmt, wobei möglicherweise die Krage region abgespalten wurde. Im nativen Gel konnten drei Banden nachgewiesen werden (siehe **Abb. 26**), die allerdings aufgrund von Crossed-Line-Immunelektrophoresen alle NnH1 zugeordnet wurden (siehe **Abb. 27b-d**). Das unterschiedliche Laufverhalten der beiden 8-Domänen-Fragmente im nativen Gel kann auf geringfügige Veränderungen in der Untereinheit, wie Verlust des Zuckers oder einiger Aminosäuren, zurückgeführt werden. Der fehlende Nachweis von NnH2 in der nativen PAGE und der kleine, nicht NnH1 entsprechende Präzipitationsgipfel in der Immunelektrophorese sprechen für einen geringeren Anteil von NnH2 in der Hämolymphe. Ein ähnliches immunologisches Muster wurde bei *Haliothis tuberculata*-Hämocyanin und *Megathura crenulata*-Hämocyanin beobachtet (Gebauer et al., 1994; Keller et al., 1999), bei denen oftmals - vor allem nach längerer Hälterung – eine Isoform überwog. Das genaue Verhältnis von NnH1 und NnH2 zueinander lässt sich anhand der bisher durchgeführten Untersuchungen nicht klären. Methoden zur Isolierung der beiden Isoformen wurden für KLH und HtH bereits

entwickelt (Harris et al., 1995; Keller et al., 1999). Bei KLH lassen sich KLH1 und KLH2 durch Gelfiltration in Anwesenheit von Ammoniummolybdat aufgrund ihres unterschiedlichen Dissoziationsverhaltens trennen. Auf gleiche Weise können die beiden Isoformen von HtH isoliert werden. Beim *Nucula nucleus*-Hämocyanin wurde zur Aufreinigung nur eine Gelfiltration bei physiologischem pH-Wert durchgeführt, bei dem keine Auftrennung erfolgte, was für die gleiche Quartärstruktur in beiden Isoformen spricht. Auf Versuche zur Isolierung von NnH1 und NnH2 wurde verzichtet, da die Menge an Protein sehr limitiert war. Der Proteinanteil in der Hämolymphe liegt bei *Nucula sulcata* etwa bei 22,6 mg ml⁻¹ (Taylor et al., 1995), was im Vergleich zu Megathuren mit etwa 10 mg ml⁻¹ relativ viel ist (van Holde & Miller, 1995); doch sind die Individuen von *Nucula* mit einer Länge von ca. 1 cm sehr klein.

2.2 *Nautilus pompilius*

Bereits elektronenmikroskopische Arbeiten von 1981 (Bonaventura et al.) zeigten, dass in der Hämolymphe von *Nautilus pompilius* das Hämocyanin ausschließlich in Form von Dekameren vorliegt. Die gleiche Situation findet man auch in *Octopus*. Unsere EM-Aufnahmen bestätigen die Ergebnisse von 1981 (siehe **Abb. 36**). Sowohl mit biochemischen Untersuchungen (siehe **Abb. 37a**) als auch auf genomischer Ebene (Kap. C 3.1) konnte nachgewiesen werden, dass das *Nautilus*-Hämocyanin aus einer Polypeptidkette mit sieben funktionellen Domänen besteht. Auch hier wird die Übereinstimmung mit dem *Octopus dofleini*-Hämocyanin deutlich, da diesem ebenfalls die letzte funktionelle Domäne, also FU-*h*, fehlt. Beim Hämocyanin von *Sepia officinalis* liegen dagegen acht FUs vor, die allerdings nicht wie bei den Gastropoden FU-*a* bis FU-*h* entsprechen. Vielmehr fand hier eine interne Verdopplung der FU-*d* statt, was durch immunbiochemische Arbeiten und Sequenzanalysen bestätigt wurde (Declercq et al., 1990; Vanderzande et al., 1990). Das Vorhandensein von drei verschiedenen Hämocyanin-Untereinheiten bei *Nautilus pompilius*, wie es Bonaventura (1981) aufgrund biochemischer Untersuchungen annahm, konnte ich nicht bestätigen. Sowohl im nativen Gel (siehe **Abb. 37b**), bei der Immunoelktrophorese (siehe **Abb. 38**) als auch auf cDNA-Ebene trat ausschließlich eine Form auf (Kap. C 3.1). Allerdings wurden auf genomischer Ebene zusätzliche Sequenzdaten gefunden, die möglicherweise eine zweite Isoform darstellen (Kap. C 3.3). Für die biochemischen Ergebnisse bedeutet dies, dass man entweder tatsächlich von einem einzelnen Gen für das *Nautilus pompilius*-Hämocyanin ausgehen kann oder aber die zweite Isoform liegt in einer wesentlich niedrigeren Konzentration in der Hämolymphe vor. Zudem könnte eine immunologische Unterscheidung

aufgrund der hohen Identität der beiden Sequenzen sehr schwierig sein. Beim *Sepia officinalis*-Hämocyanin konnten die beiden Isoformen trotz eines Sequenzunterschiedes von 20 % nicht immunologisch unterschieden werden konnten. Da bei dieser Untersuchung - wie auch beim *Nucula nucleus*-Hämocyanin - ein Antikörpermischung verwendet wurde, kann dessen Unspezifität als Grund für die fehlende Detektion nicht ausgeschlossen werden. Allerdings konnten beide Isoformen von NnH mit diesen Antikörpern erfolgreich nachgewiesen werden, die sich jedoch auch erheblich mehr unterscheiden.

Die proteolytische Spaltung des *Nautilus pompilius*-Hämocyanins mit Elastase resultierte in sieben Peaks, von denen vier Gipfel nach weiterer Spaltung mit anderen Proteasen isoliert und durch einen Vergleich der Sequenzdaten den entsprechenden Domänen zugeordnet werden konnten (siehe **Abb. 40**, **Abb. 42**, **Abb. 43**). Der aus der Aminosäuresequenz abgeleitete isoelektrische Punkt (IP) von NpH-*f* (5,96), NpH-*g* (5,93) und NpH-*a* (5,7) entspricht deren Auftrennung von Anode zu Kathode. Dagegen ist der IP von NpH-*c* (5,8) für seine weiteste Laufstrecke im Vergleich zu den anderen Domänen zu basisch. Das zeigt, dass sich mittels der isoelektrischen Punkte die Domänen nicht den entsprechenden Peaks zuordnen lassen. Der IP wird anhand der Aminosäuresequenz berechnet, während bei der Immunelektrophorese die Domänen gefaltet vorliegen und die einzelnen Abschnitte der Primärstruktur unterschiedlich stark exponiert sind. Zudem könnten an die Domäne gebundene Zucker das Laufverhalten beeinflussen. Die Aufschlüsselung der übrigen Gipfel im immunoelektrophoretischen Muster erwies sich als schwierig, da NpH-*b*, NpH-*d* und NpH-*e* nicht isoliert und den entsprechenden Peaks zugeordnet werden konnten. Somit kann man nur anhand der Muster in den immunologischen Gelbildern spekulieren. Eine Vermutung dabei ist, dass es sich bei dem 2-Domänen-Fragment in **Abb. 44** um NpH-*de* handelt, da diese FUs die einzigen nebeneinander liegenden, unbekannt Domänen sind. Zudem war *de* bei allen bisher untersuchten Mollusken-Hämocyaninen ein typisches Fragment (Gebauer et al., 1994; Söhngen et al, 1997; Keller et al., 1999). Da sich in Linkerregion von NpH-*e* eine potentielle N-glykosidische Bindungsstelle befindet, könnte möglicherweise ein Zuckerrest die Spaltung zwischen diesen beiden Domänen verhindern. NpH-*b* könnte der in **Abb. 40** mit einer Pfeilspitze markierte Gipfel sein. Dieser Peak ist sehr schwach ausgeprägt, was möglicherweise für eine geringere Spezifität der Antikörper gegen die Epitope dieser Domäne spricht. Ähnliches findet man auch bei der Elastase-Spaltung von KLH1, in deren Muster KLH1-*f* ebenfalls nur schwach präzipitiert wird (Harris & Markl, 2000). Eine Besonderheit des Spaltmusters von NpH liegt in den Doppelpeaks von NpH-*a* (Pfeil 3+4) und NpH-*c* (Pfeil 1+2) (siehe **Abb. 40**), die auf immunologisch identische Proteine hindeuten. Diese treten bei verschiedenen Elastase-Spaltungen mit unterschiedlicher Intensität auf. Bei NpH-*c*

verschwindet dieser ‚Anhang‘ oftmals völlig. Als Erklärung wäre denkbar, dass sowohl NpH-*a* als auch NpH-*c* in zwei verschiedene Fragmente gespalten werden. Der Hauptgipfel entspricht dabei der eigentlichen Domäne (Pfeil 1 + 3), der von den vereinzelt Monodomänen-Fragmenten bei der Crossed-Line-Immunelektrophorese angehoben wurde. Der kleinere Nebenpeak könnte einerseits einem kürzeren Spaltprodukt aufgrund einer internen Spaltung der Elastase oder Instabilität der Domäne entsprechen. Andererseits wäre auch eine Spaltung innerhalb von NpH-*b* vorstellbar, so dass die Nebenpeaks NpH-*a* bzw. NpH-*c* darstellen, die zusätzlich um ein Spaltfragment von NpH-*b* verlängert sind (Pfeil 2 + 4). Als Hinweis auf eine interne Spaltung könnte man die bei der Elastase-Spaltung auftretenden Bande bei ~ 70 kDa sehen (siehe **Abb. 39**). Die Bande bei ~ 30 kDa im SDS-Gel könnte aus der Abspaltung des NpH-*b*-Bruchstücks von NpH-*c* resultieren, was das häufige Verschwinden des Anhangs an dieser Domäne erklären könnte. Der Vorschlag einer internen Spaltung von NpH-*b* würde allerdings den schwachen Gipfel im Elastase-Spaltungsmuster nicht begründen. Da diese Erklärungen alle sehr spekulativ sind und zudem Fragen offen lassen, sind weitere Analysen zur endgültigen Klärung notwendig. Dabei wäre es sinnvoll, weitere Proteasen zu testen und die Größentrennung der einzelnen Spaltprodukte zu verbessern.

3. Die Hämocyanin-Sequenz von *Nucula nucleus* und *Nautilus pompilius*

In dem folgenden Alignment (**Abb. 47**) sind die bereits bekannten Hämocyanin-Sequenzen von *Haliotis tuberculata* (HtH1) und *Octopus dofleini* (OdH) im Vergleich zu den in dieser Arbeit analysierten, von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen dargestellt. Anhand dieses Sequenzvergleichs sollen die typischen Sequenzmerkmale des Hämocyanins kurz erläutert werden, bevor näher auf die Eigentümlichkeiten des *Nucula nucleus*- und *Nautilus pompilius*-Hämocyanins eingegangen wird.

| | β4 | β5 | α6 | α7 | α8 | α9 | α10 | α11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---------------------|------------|-------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------|------------|------------|----------|----------|------------|------------|---------|----------|---------|----------|---------|-------|------|-------|---------|-------|------|----|----|-------|
| Ht1-a: | NWYRG--EIAFINKK-- | TARAVDDR-- | LFEKVEP--GHYTHLMEV | DAL | EOEDFCGFEIOFLANAL | YIL | VGKFEYSMSN | LETSYDE | FLHHSNVD | RUFALV | ORLQELR | GKPNAM | CA | HELHAQC | QPF | NR | DSN | : 253 | | | | | | | | | | |
| NnH1-a: | NWYHG--VIKD--AGT-- | TDRAIDDR-- | LFEQEPF--GHYTNAMKVL | LAL | EOEDYCKEIOEVAEND | IEL | YLVGRGKYSMS | LETSYDE | FLHHSNVD | RUFALV | QALQKR | GLPWHDS | G | LEMFRTI | EPF | GR | DSN | : 252 | | | | | | | | | | |
| NnH2-a: | NWHEG--KIDD--NHH-- | TDRAIDDR-- | LYEQEE--GHYTHIMEKVL | LAL | EOEDYCHEEVOEVAND | IDL | YLVGDHSMNSN | LETSYDE | FLHHSNVD | RUFALV | IKLQKR | GLPWHDA | CA | IDQMHD | KPF | SL | DSN | : 252 | | | | | | | | | | |
| NpH-a: | NWYSG--TIGFKKMQ-- | TARAVDDR-- | LFSOEPF--GHHTFIFEGII | LAL | EOEDYCOEVOEFLANAL | YIL | YVGGPHSMSN | LETSYDE | FLHHSNVD | RUFALV | IQALQKR | GLPWSHNS | CA | KELFTVWK | KPF | NE | DSN | : 257 | | | | | | | | | | |
| Odh-a: | NWYSG--NIAFEKKT-- | TARAVDR-- | LFOQSK--GGKFNFLLEG | SAL | EOEDDYCHEEVOEVAN | LI | YVGRFTHSMS | LETSYDE | FLHHSNVE | RFTV | IQALQKR | GIE | GNAN | G | LNMFHK | MEPF | GR | DTN | : 251 | | | | | | | | | |
| NnH1-b: | NPFNA--NIFEEGHE | ISRMTDSK-- | LFPAPAF--GESHSHLEGII | YAF | EOEDFCOEIOEFLVNS | I | AWIGSEDSY | WALH | WTAFADE | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | HKI | PY | QA | CA | OSVEQL | EV | KPFA | RSP | SPIN | : 266 | | | | | | |
| NnH1-b: | NPFHG--SVAIFGHV-- | TDROPDSR-- | LFEEDSY--GDHTALFDGM | LAL | EOEDFCOEVOEFTEN | L | AWGSAKYSMS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | GKY | KY | KA | CA | TTYTYE | KPFA | KSPIN | : 265 | | | | | | | | | |
| NnH2-b: | NPFLQ--NIAFKGAV-- | TDRAVDNK-- | LFNNSH-- | --- | LFDQWMLAF | EOEDFCOEVOEFTN | EL | HALVGNLDYS | WALH | WTAFADE | FLHHSNVD | RUWALV | QALQ | THRE | KPF | KA | CA | ASATFE | KPFA | RSP | SPIN | : 259 | | | | | | |
| NpH-b: | NPFHG--SIDFLHDHI | TDRDLKQE-- | TLFEQPAF--GDHTYLF | DGLM | YAL | EOEDFCOEIOEIVN | GL | AWTGQQTYS | MSLH | WTAFADE | FLHHSNVD | RUWALV | QALQ | LYR | GKHY | LA | CA | NSEVHSE | MRPF | SPP | SPRN | : 267 | | | | | | |
| Odh-b: | NPFYHA--KIEFLHNDV | TARVDSR-- | LFEKPTK--GHGYLHDGM | LAF | EOEDFCOEVOEFTNAL | I | AWGNEPYSMS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQ | THRE | KPF | KA | CA | LSEVHRE | KPFA | EAPPIN | : 267 | | | | | | | | | |
| Ht1-c: | NPWFNG--HIDIVNQD-- | TTRSRYED-- | LYQOEF--GHFTDIAQQM | LAL | EOEDFCOEVOEISN | FI | ALVGGTDAY | WASLR | TAYDE | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | GKY | PY | TAN | CA | IFSMRRE | IQPF | GLSSAIN | : 265 | | | | | | | | |
| NnH1-c: | NPFYDFVVEGYSHT-- | TSRAPRQE-- | LFPENGF--GKHTTKVAKQM | LAF | EOEDFCSEETQFLAN | L | I | AYVGGKDEYS | WASLR | TAYDE | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | GKY | PNRAN | CA | LDSMRA | LKPF | AMPSSVN | : 265 | | | | | | | | |
| NnH2-c: | NPFLKFGYEDGTVHF-- | TSRSNVND-- | LYEDPGY--GKYTKIAEQM | LAF | EOEDFCOEIOEIAH | NI | HLVGG | --- | SWGSLK | WTAFADE | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | GKY | DRAT | D | LEAMNKE | LKPF | SOAS | -- | N | : 258 | | | | | | |
| NpH-c: | NPLHNG--HIDSVNAD-- | TRNINEK-- | LFEQPEF--GHFTLLANQV | LAL | EOEDFCOEVOEISN | EL | ALVGGTEPYS | WASLR | TAYDE | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | GKHS | SAN | CA | LQQLHQ | LKPF | SILTSEVN | : 265 | | | | | | | | | |
| Odh-c: | NPFFSG--VIDETGEH-- | TTRSPNPT-- | LFLKPPF--GHFTPLGDE | VYAL | EOEDFCOEVOEFLAN | HI | HALVGGTEPYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | GKHS | SAN | CA | IELTRK | EV | SPR | SILTSDIN | : 265 | | | | | | | | | |
| Ht1-d: | NPFFRG--KVTFENAV-- | TTRDPQAG-- | LFLNS | --- | DYMXENVAL | LAL | EOENYCOEIOEFLV | NAL | HWLGGKQYS | MSLH | WTAFADE | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | INLMHQ | LKPF | SDDP | HDN | : 259 | | | | | | |
| NnH1-d: | NPFFSG--DIPGENSD-- | TSRDPQPR-- | LFLNN | --- | DYFYDNM | LAF | EOETSFCEIOEFLV | NAL | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| NnH2-d: | NPFFHG--TYQG--HT-- | TORDYQPR-- | LFLNT | --- | DYFYEGM | LAF | EOEDFCOEIOEFLV | NAL | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| NpH-d: | NPFFRG--SIFLNASH-- | TTRDPQPE-- | LFLNS | --- | DYLYENTIL | LAL | EOEDFCOEIOEFLV | NAL | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| Odh-d: | NPFFKG--KISFLNSE-- | TNRDPQEE-- | LFGN | --- | KYLYEHITL | FVL | EOEDFCOEIOEFLV | NAL | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| Ht1-e: | NPFLGA--DIEFEGPV | TERHINTE-- | RLFHSGDHG | YHNWFETV | FAL | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| NnH1-e: | NPFHHA--DINPFGAGV | TRSPNEQ-- | RLFEDPSL--GYNTWLFENV | LAL | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | | |
| NnH2-e: | NPFHHA--AIEFLGEGID | TRDPQGD-- | HLFAPLTS--GYNTWLFENV | LAL | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | | |
| NpH-e: | NPFNQG--HLSFTISPEV | TORDVQ-- | D--KLFKQPKL--GRNTWLDHNV | LAL | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | | |
| Ht1-f: | NPFARG--YKIKDAF-- | TVRNQES-- | LFKMSFF--GKHSLLFDQAL | LAL | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | | |
| NnH1-f: | NPFARG--YIESEDY-- | TVRDVRNEFK | LFDNAPD--AKHSIL | LFDQAL | LAL | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| NnH2-f: | NPFLRG--SIDS--DTV-- | TVRQOSE-- | LFNLGPD--SKHSILYDGL | VYAL | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | | |
| NpH-f: | NPFLRG--HIEVAEY-- | TVRNTQPE-- | LFEPSKD--GKHSLLYDE | II | LAL | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| Odh-f: | NPFLRG--YIKSEDTY-- | TVRDVKPE-- | LFEIG--G | EGSTLYQQM | LML | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| Ht1-g: | NPFQHG--HIDYL | NVS | TTRSPRDM-- | LFNDEPH--GSESFY | RQML | LAL | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | |
| NnH1-g: | NPWVHA--HIEYLN | EV | TTRAPRPQ-- | LFLKDEPH--NEGS | FFYRQML | LAF | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | |
| NnH2-g: | NPFHG--TIDFWHER-- | TTRAPRPQ-- | LFLSDPEH--NEGS | FFYRQML | LAF | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| NpH-g: | NPFHHA--KIEFT | NVT | LFTDQRY--GETS | FFYRQML | LAL | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| Odh-g: | NPFHHA--HIDVANTD-- | TTRSPRAQ-- | LFDDPEK--GDKS | FFYRQML | LAL | EOEDYCOEIOEFLAN | L | I | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| Ht1-h: | NPFYKY--YIRGQHE-- | TTRDYNQR-- | LFVQK | GF | DYLYL | LQVL | EOENS | COEIOEFLAN | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | | |
| NnH1-h: | NPFYKY--HIGFANTD-- | TREGVDQD | LFNQ | SFY | GKNY | LYL | L | EOENS | COEIOEFLAN | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 | | | | |
| NnH2-h: | NPFYHF--HITSAGTD-- | TLRNVN | LV | LQD | FT | HG | YH | YL | IT | LENN | F | EOENS | COEIOEFLAN | HWLGGRAHYS | SLHHTAF | FLHHSNVD | RUWALV | QALQKR | ELP | YEAN | CA | S | INLMRKE | LKPF | YAGD | -- | EN | : 254 |

S-S

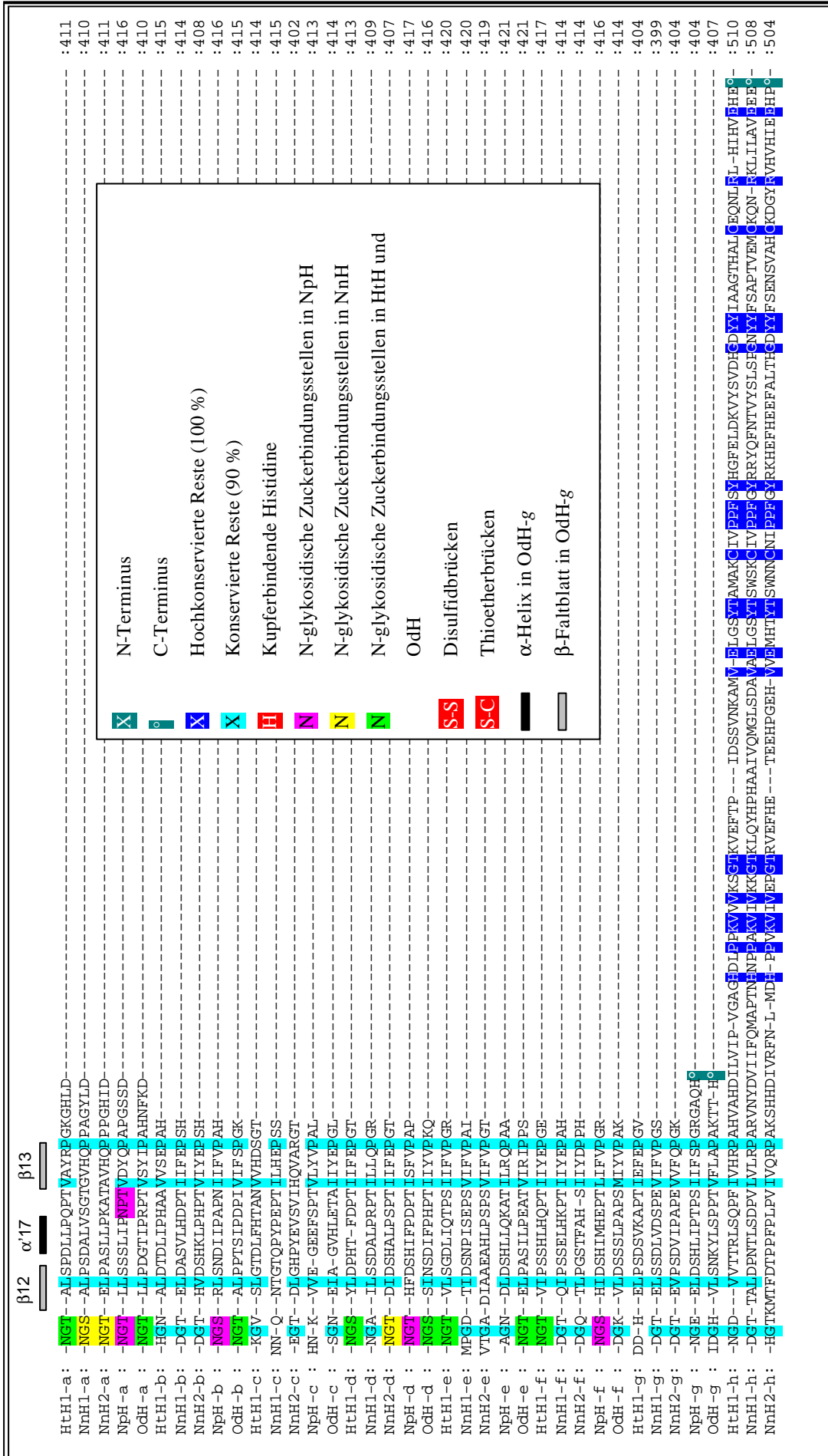


Abb. 47.: Multiples Alignment der Aminosäuresequenzen der FUs von *Haliotis tuberculata* (HtH1), *Octopus dofleini* (OdH), *Nautilus pompilius* (NpH) und *Nucula nucleus* (NnH1/NnH2).

Der konservierte Bereich umspannt die beiden Kupferbindungsstellen CuA und CuB, während die Linkerbereiche die höchste Variabilität aufweisen. Zu den streng beibehaltenen Merkmalen gehört neben den sechs Histidinresten, die für die Kupferbindung verantwortlich sind, zwei Disulfidbrücken zwischen den Positionen Cys 66 - Cys 77 und Cys 199 - Cys 266. Diese spielen eine große Rolle bei der Sauerstoffbindung, da diese Fähigkeit bei Reduktion der Disulfidbrücken verloren geht (Topham et al., 1999; Georgieva et al., 2004). Eine dritte Disulfidbrücke liegt zwischen Cys 359 - Cys 371 vor, die allerdings nur in den funktionellen Domänen *a*, *d*, *e* und *g* bei allen bisher untersuchten Mollusken-Hämocyaninen vorkommt. Die größere Bedeutung der ersten beiden Disulfidbrücken wird deutlich, wenn man sich ihre Lage in den verfügbaren Röntgenstrukturen (Cuff et al., 1998; Perbandt et al., 2003) betrachtet (**Abb. 48**). Ihre Position hat ganz offensichtlich einen stabilisierenden Einfluss auf die Kerndomäne. Dagegen befindet sich die dritte Disulfidbrücke an der Oberfläche der peripheren β -Sandwich-Domäne. Ein weiteres typisches Strukturelement ist die hochkonservierte Thioetherbrücke zwischen Cys 78 und His 80.

In der Sequenz gibt es potentielle N-glykosidische Bindungsstellen, die an den Motiven ‚NXT‘ (Asn-Xaa-Thr) oder ‚NXS‘ (Asn-Xaa-Ser) zu erkennen sind. Trägt die zentrale Aminosäure ein Prolin (NPT/S; Asn-Pro-Thr/Ser), wird die Bindungsstelle blockiert (Bause, 1983). Den meisten Mollusken-Hämocyaninen ist gemeinsam, dass in FU-*c* keine potentielle N-glykosidische Bindungsstelle vorhanden ist. In *Octopus dofleini* findet man zwar ein Motiv, doch ist auch dieses durch ein Prolin blockiert (‚NPT‘).

Die Kristallstruktur von OdH-*g* enthält zwischen den Faltblättern $\beta 2$ und $\beta 3$ eine Glykosylierungsstelle, die mit einem N-Glykan besetzt ist. Dieser Zucker schließt eine Lücke in der dreidimensionalen Struktur. Ähnliches findet man auch bei einem Großteil der anderen sequenzierten Domänen, bei denen zwischen den Faltblättern $\beta 11$ und $\beta 12$ eine potentielle N-Glykosylierungsstelle vorhanden ist (Lieb et al., 2000). Bindet hier ein Zucker, so schließt er die Lücke von der gegenüberliegenden Seite im Vergleich zu OdH-*g* (**Abb. 48**). Detaillierte Zuckeranalysen von Mollusken-Hämocyaninen weisen eine große Vielfalt an verschiedenen N-Glykanen auf und bestätigen die potentiellen Glykosylierungsstellen als tatsächlichen Verankerungspunkt (Hall et al., 1977; Kurokawa et al., 2002). Bei den beiden funktionellen Domänen OdH-*g* von *Octopus* und RtH-*e* von *Rapana* konnte dies direkt mittels Röntgenkristallographie nachgewiesen werden (Cuff et al., 1998; Perbandt et al., 2003). Wenig dagegen ist bekannt über die Funktion, biologische Bedeutung und Variabilität des Glykosylierungsmusters. Man geht davon aus, dass sie entscheidend zur dreidimensionalen

Struktur beitragen und zudem Interaktionen zwischen den Untereinheiten beeinflussen (Stoeva et al., 2002).

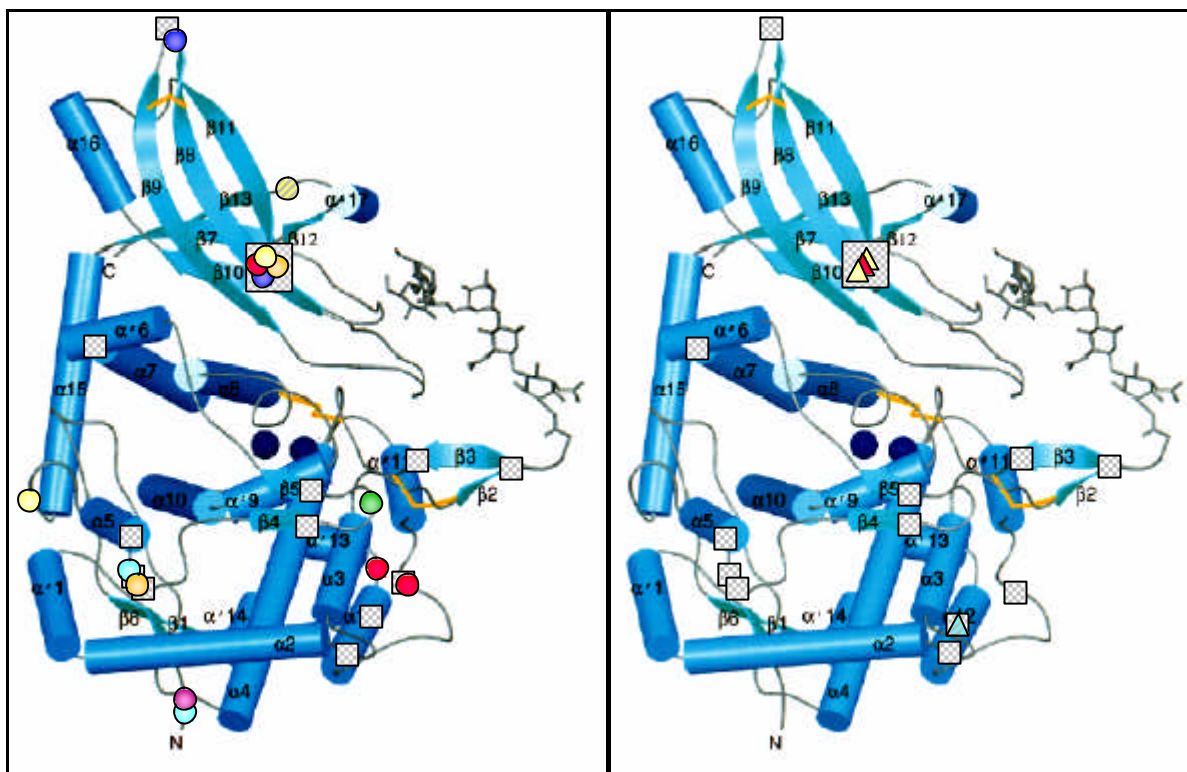


Abb. 48: Schematische Darstellung der potentiellen N-glykosidischen Bindungsstellen anhand der Kristallstruktur von OdH-g von *Octopus dofleini*-Hämocyanin.

In der linken Grafik sind die potentiellen Zuckerbindungsstellen von *Nautilus pompilius* als Kreise (?) gekennzeichnet, in der rechten Abbildung ist die Position dieser Sequenzmotive von *Nucula nucleus* als Dreiecke (?) dargestellt. Die farbige Markierung entspricht der Zuordnung der Domänen. Zum Vergleich wurden in beiden Grafiken die potentiellen N-glykosidischen Bindungsstellen von *Haliotis tuberculata*-Hämocyanin und *Octopus dofleini*-Hämocyanin als graue Vierecke (□) eingezeichnet. Die Disulfidbrücken sind gelb markiert.

3.1 Besonderheiten bei *Nucula nucleus*-Hämocyanin

Vergleicht man die Sequenzen der beiden Isoformen von *Nucula nucleus* mit bereits bekannten Hämocyanin-Sequenzen sowie mit den beiden Röntgenstrukturen, so sticht sofort eine markante Eigentümlichkeit zwischen den β -Faltblättern $\beta 2$ und $\beta 3$ hervor. An dieser Stelle liegen bei NnH-c, NnH-d, NnH-f und NnH-g Deletionen, die in NnH-c zwei Aminosäuren und bei den anderen Domänen sechs Aminosäuren umfassen. Zudem fällt auf, dass vor den Deletionen in der Primärstruktur ein Glycin auftritt, das möglicherweise aufgrund seiner geringen Größe die enge Schlaufe zwischen den beiden Faltblättern erleichtert.

In anderen Regionen liegen weitere ‚Indels‘ – also **I**nsertionen oder **D**eletionen von Nukleotiden - vor, die allerdings kürzere Abschnitte umfassen und zudem in Bereichen zwischen Sekundärstrukturelementen zu finden sind.

Vergleicht man die beiden Isoformen miteinander, so weisen diese einige Unterschiede auf. NnH1 enthält im codierenden Bereich 20 zusätzliche Aminosäuren, die in nicht konservierten Bereichen auf alle acht Domänen verteilt sind. Ein weiterer Unterschied zwischen den Isoformen besteht in der dritten Disulfidbrücke, die in NnH2-*c* fehlt, in NnH1-*c* dagegen vorhanden ist. Möglicherweise wird dieses fehlende Strukturelement von der Deletion von sechs Aminosäuren in diesem Bereich kompensiert, was die Schlaufe zwischen $\beta 8$ und $\beta 9$ ermöglicht.

Es treten bei beiden Isoformen zusammen nur vier potentielle N-glykosidische Bindungsstellen auf, was im Vergleich zu den schon bekannten Hämocyaninen eine sehr geringe Anzahl ist (siehe **Abb. 47**). Bei NnH2-*e* befindet sich eine Glykosylierungsstelle zwischen den Helices $\alpha 11$ und $\alpha 12$, die allerdings ein zentrales Prolin trägt (NPS') und daher vermutlich blockiert ist (Bause, 1983). Die übrigen drei Motive liegen zwischen den Faltblättern $\beta 11$ und $\beta 12$ und zwar in den funktionellen Domänen NnH1-*a*, NnH2-*a* und NnH2-*d*. Die vergleichsweise geringe Anzahl an N-glykosidischen Bindungsstellen passt zu dem schwachen Signal im Lektin-Bindungstest (siehe **Abb. 46**). Hierbei zeigte *Nautilus pompilius* eine deutlich stärkere Reaktion, was der vierfach höheren Anzahl an N-glykosidischen Bindungsstellen entspricht. Das kaum sichtbare Signal von *Megathura crenulata*-Hämocyanin könnte möglicherweise aus einer Unzugänglichkeit des N-Acetylglucosamin-Restes resultieren, da hieran eine Vielzahl von Zucker gekoppelt sind (Wuhrer et al., 2003). Für NnH und NpH würde das gleichzeitig bedeuten, dass dieses Monosaccharid bei ihnen zugänglich ist. Dieser Lektin-Test liefert allerdings nur erste Hinweise, die durch weitere Zuckeranalysen verifiziert und umfassender dargelegt werden müssten. Die ungleiche Verteilung der Glykosylierungsstellen in den beiden Isoformen hat möglicherweise einen Einfluss auf die jeweilige biologische Funktion. Sie könnte beispielsweise eine Signalfunktion sein, die eine unterschiedliche Regulation der beiden Isoformen zulässt. Die Frage nach Glykosylierung als Unterscheidungsmerkmal wurde bereits für die Isoformen des *Megathura crenulata*-Hämocyanins aufgeworfen. Bei längerer Hälterung von *Megathura crenulata* verschwindet KLH1 sukzessive, da es möglicherweise als Aminosäurequelle dient. KLH2 bleibt dagegen als Sauerstofftransporter bestehen (Markl et al., 1991; Gebauer et al., 1994). Zur Unterscheidung zwischen den beiden Isoformen

könnte ein O-glykosidischer Zucker in KLH2-c dienen, der von einem spezifischen Oberflächenrezeptor in der Mitteldarmdrüse erkannt wird (Harris & Markl, 2000).

3.2 Eigentümlichkeiten beim Hämocyanin von *Nautilus pompilius*

Vergleicht man die Sequenz von NpH und OdH, so finden sich an einigen Stellen Indels. Diese entsprechen hier meist einer Länge von einzelnen Aminosäuren und sind in Bereichen außerhalb der Sekundärstrukturen lokalisiert, wie man aus den Kristallstrukturen ableiten kann. Die Ausnahme stellt eine Lücke von vier Aminosäuren dar, die sich in NpH-g zwischen den Faltblättern $\beta 2$ und $\beta 3$ befindet. Interessanterweise ist diese Deletion an der gleichen Stelle, wie sie bei *Nucula nucleus*-Hämocyanin auftritt (siehe Kapitel D 3.1). Anstelle eines Glycins liegt bei NpH ein Prolin vor, das häufig an Knickpunkten von Proteinketten zu finden ist. Bei den anderen bereits sequenzierten Mollusken-Hämocyaninen bilden diese Aminosäuren einen hochkonservierten ‚loop‘. Um diese Abweichung zu verdeutlichen, wurde basierend auf der vorhandenen Kristallstruktur von OdH-g mittels molekularem Modeling eine dreidimensionale Struktur von NpH-g erstellt (**Abb. 49**).

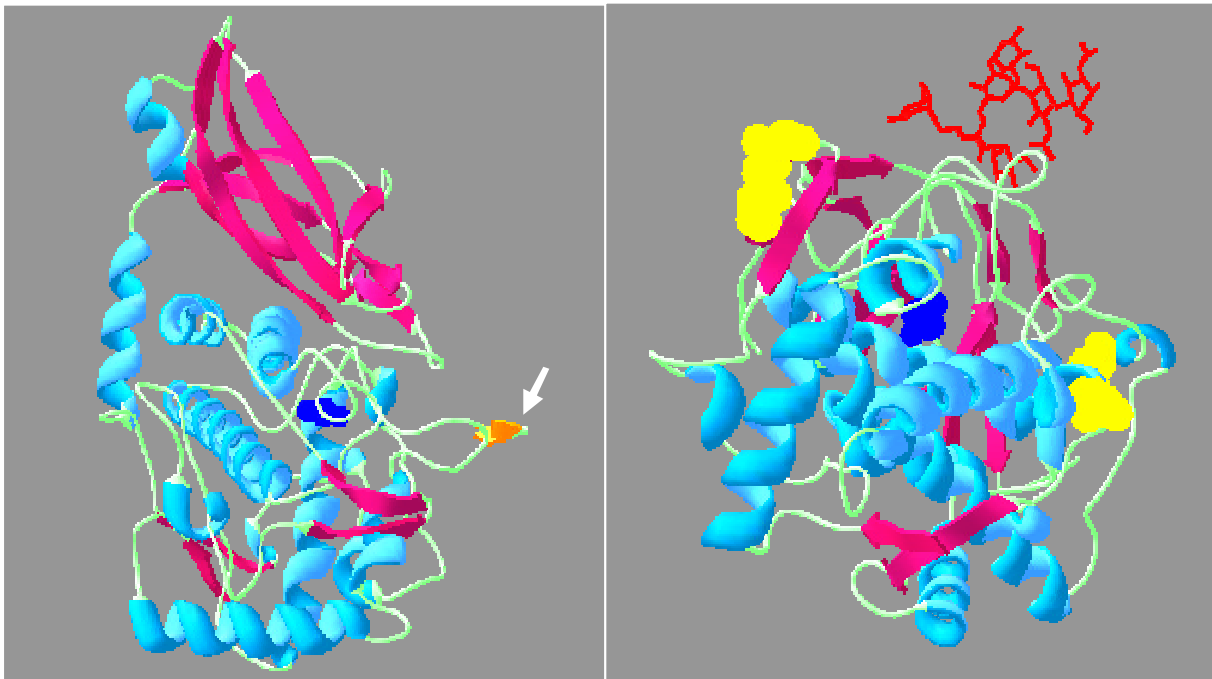


Abb. 49: Ein Strukturmodell von NpH-g.

Die Struktur wurde anhand der Kristallstruktur von OdH-g (Cuff et al., 1998) modelliert. Die Kupferatome sind blau gekennzeichnet. a) Die zusätzliche Schleife (weißer Pfeil) von OdH-g ist orange markiert. Dieser ‚loop‘ enthält eine potentielle N-glykosidische Bindungsstelle. b) Die Ansicht von unten zeigt die Position von zwei potentiellen N-glykosidischen Bindungsstellen in NpH-g (gelb) im Vergleich zu der einen in OdH-g (rot).

Dabei zeigte sich eine gute strukturelle Übereinstimmung mit Ausnahme dieser Schleife. Bei OdH-g enthält sie zudem eine Glykosylierungsstelle, die mit einem N-Glykan besetzt ist. In NpH-g liegt weder an dieser Position noch an der gegenüberliegenden Schleife zwischen $\beta 11$ und $\beta 12$ eine Zuckerbindungsstelle vor. Stattdessen befinden sich in dieser Domäne zwei, für *Nautilus*-Hämocyanin spezifische potentielle N-glykosidische Bindungsstellen. Diese Domäne hat also in NpH ein völlig anderes Muster an Zuckerbindungsstellen als OdH. In der Sequenz des *Nautilus*-Hämocyanins gibt es 13 potentielle N-glykosidische Bindungsstellen, die an den Motiven ‚NXT‘ oder ‚NXS‘ zu erkennen sind. Eine weitere findet sich in NpH-a, die allerdings als zentrale Aminosäure ein Prolin trägt (‚NPT‘) und daher blockiert sein sollte (Bause, 1983). In den Linkerpeptiden von NpH-c und NpH-e existiert jeweils eine N-glykosidische Bindungsstelle, wohingegen bei den bisher sequenzierten Hämocyaninen in diesem Bereich kein solches Motiv aufgetreten ist. Die potentielle N-glykosidische Bindungsstelle in FU-c tritt bisher nur bei NpH auf. OdH-d und NpH-d zeigen eine auffallende Übereinstimmung. Dort befindet sich zwischen $\alpha 11$ und $\alpha 12$ eine potentielle Glykosylierungsstelle. Aufgrund der peripheren Lage könnte ein an diese Position geknüpfter Zucker eine wichtige Funktion beim Cephalopoden-Hämocyanin übernehmen. Die am häufigsten auftretende N-Glykosylierungsstelle in den funktionellen Domänen liegt zwischen $\beta 11$ und $\beta 12$, wie es auch in den Domänen a, b, d und e von *Nautilus pompilius* der Fall ist. Die dritte Disulfidbrücke liegt zwischen Cys 359 - Cys 371 vor, fehlt allerdings in der FU-b von allen bereits sequenzierten Mollusken-Hämocyaninen. Ebenso treten diese Cysteine nicht in FU-c aller bisher sequenzierten Cephalopoden-Hämocyanine auf, was daher eine typische Eigenschaft dieser Klasse sein könnte.

Bei der Sequenzierung des *Nautilus pompilius*-Hämocyanins wurden neben einer durchgehenden Polypeptidkette noch zwei Sequenzen gefunden, die zwei weiteren Domänen zugeordnet werden konnten. Da die Übereinstimmung zwischen den beiden sich entsprechenden Domänen nur etwa ~ 67 % und ~ 83 % betrug, ist nicht von Allelen auszugehen, da hierbei die Sequenzidentität meist bei über 98 % liegt. Somit bleiben zwei Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnte es sich um eine zweite Hämocyanin-Isoform handeln, wie sie auch bei anderen Mollusken vorkommt. Innerhalb der Cephalopoden existieren bei *Octopus dofleini* zwei Isoformen, die jedoch mit etwa 96 % eine sehr hohe Übereinstimmung aufweisen, allerdings auf genomischer Ebene eindeutig zu unterscheiden sind (Miller & van Holde, 2003). Auch bei *Sepia officinalis* liegen zwei verschiedene Hämocyanin-Polypeptidketten vor, die ungefähr 80 % Sequenzidentität zeigen (unveröffentlicht). Daher wäre es nicht verwunderlich, wenn auch bei *Nautilus pompilius* eine

zweite Isoform existieren würde. Sonderbar dagegen ist, dass die beiden Sequenzen nur auf genomischer Ebene entdeckt wurden, während alle durchgeführten *RT-PCRs* auf eine einzige Sequenz hinwiesen. Auch bei den biochemischen Analysen konnte kein zweites Hämocyanin nachgewiesen werden, wie bereits unter D 2.2 diskutiert wurde. Vielleicht werden die beiden Isoformen sehr unterschiedlich stark exprimiert oder die eine wird schneller abgebaut. Belege, dass Hämocyanin-Isoformen unterschiedlich stark exprimiert bzw. sequestriert werden, liegen vom KLH und HtH vor (Keller et al., 1999; Gebauer et al., 1994). Ebenso gibt es erste Hinweise auf eine unterschiedlich starke Genexpression der Hämocyanin-Isoformen von HtH (unveröffentlicht). Andererseits könnten die zusätzlichen Sequenzen aus einem Pseudogen stammen. Zur endgültigen Aufklärung bedarf es weiterer Analysen.

4. Die Genstruktur des Hämocyanins

Die Genstruktur der Mollusken-Hämocyanine unterstreicht das heute favorisierte Modell der Intron-Evolution, dass es sowohl sehr ursprüngliche als auch neu eingefügte Introns gibt (Fedorova & Fedorov, 2003; Roy, 2003;). Die hintereinander in der Polypeptidkette angeordneten funktionellen Domänen entsprechen im Gen einer Serie von Exons, die durch Linkerintrons getrennt werden. Diese Introns liegen ausnahmslos in Phase 1 vor, was bereits von anderen Mollusken-Hämocyanin-Genen bekannt ist (Lieb et al., 2001). Sie sind an fast äquivalenten Positionen inseriert, *downstream* einer konservierten β -Faltblattregion der vorangehenden Domäne und *upstream* des konservierten Sequenzmotivs der ersten α -Helix der nachfolgenden Domäne. Die Linkersequenz vor der ersten α -Helix ist wenig konserviert und könnte ein Relikt des Signalpeptids sein, das vermutlich vor der Duplikation des monomeren Vorläuferproteins vorhanden war (Lieb et al., 2001). Die Variabilität in diesem Bereich kann mit dem Funktionsverlust als Signalpeptid und damit dem verringerten Selektionsdruck begründet werden.

Die Aufrechterhaltung der Phase und Position der Linkerintrons zeigt, dass es sich um sehr ‚ursprüngliche‘ Introns handelt, was für die ‚Intron-early‘-Hypothese spricht (Lieb et al., 2001). Das ursprüngliche Linkerintron war vermutlich Bestandteil des monomeren Vorläufergens und wurden bei der Entstehung der Multi-Domänen-Struktur ebenfalls dupliziert (Lieb et al., 2001).

Die Proteinumgebung der Linkerintrons der einzelnen FUs von *Haliotis tuberculata*, *Octopus dofleini*, *Nucula nucleus* und *Nautilus pompilius* zeigt **Abb. 50**.

| | $\alpha 17$ | $\beta 13$ | $\beta 1$ |
|----------|----------------------------|------------|------------------------|
| NpH-a/b | LSSSLIPNPTVDYQPAPGSSD..... | | PPMRQIDREKLVVRK |
| OdH-a/b | LPDGTIPRPTVSYIPAHNFKD..... | | ADMVVVDKTGLNVRK |
| NnH1-a/b | LPSDALVSGTGVHQPPAGYLD..... | | PKPAPVDRTGLAVRK |
| NnH2-a/b | LPASLLPKATAVHQPPGHID..... | | TAPHHGDVRLHTRK |
| HtH1-a/b | LSPDLLPQPTVAYRPGKGHLD..... | | PPVHHRHDDDLIVRK |
| NpH-b/c | LSNDIIPAPNIIIFVPA..... | | HVKSMNISHKGHTRR |
| OdH-b/c | LPPTSIPDPVIVFSPGK..... | | KESGVVFDELYRSRR |
| NnH1-b/c | LDASVLHDPTIIFEPSH..... | | AAE-DRPTDFRVVRK |
| NnH2-b/c | VDSHKLPHPTVIYEPSH..... | | GAEYKDHADYHTRK |
| HtH1-b/c | LDTDLI PHAAVSEPAH..... | | PTFEDEKHS-LRIRK |
| NpH-c/d | VEGEEFS-PTVLYVPAL..... | | GTYGTQTKWREPVTSASIRK |
| OdH-c/d | IAGVHLETA-IIYEPGL..... | | GNFGEAGIWEVPTSANRIRK |
| NnH1-c/d | TGTQPYPEPTIILHEPSS..... | | GA-GVDHEYEVEVTTASHIRK |
| NnH2-c/d | LGHPIYEVSVIHQVARGT..... | | YR-GDEDEFEEVITTASHIRK |
| HtH1-c/d | LGTDLFHTANVVHDSGT..... | | GT-RDRDNYVEEVTGASHIRK |
| NpH-d/e | FDSHIFPDPTISFVPAP..... | | GSKNATHYQEEHHHFVRK |
| OdH-d/e | INSDIFPHPTIIYVPKQ..... | | D-HSADIKSEEGNEYLVRK |
| NnH1-d/e | LSSDALPRPTIILQVGR..... | | GAA--APHGGSDVTVRK |
| NnH2-d/e | IDSHALPSPPTIIFEPGT..... | | EDH--VDHSHDEKHLVRK |
| HtH1-d/e | LDPHTF-DPTIIFEPGT..... | | DTHI--LDHDHEEEILVRK |
| NpH-e/f | LDSHLLQKATILRQAAA..... | | EHHEVHH-PLNRIIRH |
| OdH-e/f | LPASILPEATVIRIPPS..... | | NEDADIDTPLNHIRR |
| NnH1-e/f | IDSNPISEPSVIFVPAI..... | | VDHNEDKFAHNQVRR |
| NnH2-e/f | AAEAHLPSPSVIFVPGT..... | | GDHNTDAFPDNRIRH |
| HtH1-e/f | LSGDLIQTPSIIFVPGR..... | | HKLNSRKHTPNRVRH |
| NpH-f/g | IDSHIMHEPTLIFVPGR..... | | NTKQAERERRISGGPIIRK |
| OdH-f/g | LDSSSLPAPSMIYVPAK..... | | DFK-REVHKKTVGDALIRN |
| NnH1-f/g | IPSELHKPTIIEYPAH..... | | GHE-SSVGVASHAGRGVRK |
| NnH2-f/g | TLPGSTFAHSIYDPPH..... | | SAG-DHDPDPTLSGHGVRK |
| HtH1-f/g | IPSSHLHQPTIIEYEPGE..... | | DHH-DDHQSGSIAGSGVRK |
| NpH-g | LDSHLIPTPSIIFSPGRGAQH | | |
| OdH-g | LSNKYLSPTTVFLAPAKT-TH | | |
| NnH1-g/h | LSSDLVDSPEVIFVPGS..... | | ATHEHHTV--HED-HRDVLLRK |
| NnH2-g/h | VPSDVIPAPEVVFQPGK..... | | AHKTH-PVHAHDD-LRDMYIRK |
| HtH1-g/h | LPSDSVKAPTIEFEPGV..... | | HRGGKHEDEHDDRLADVLIRK |
| NnH1-h | LDPNTLSDPVLLVLRPARVNY~~ | 98 | ~~EEE |
| NnH2-h | FDTPPFPLPVIVQRPAAKSHH~~ | 92 | ~~EHP |
| HtH1-h | VVTRLSQPFIVHRPAHVAH~~ | 93 | ~~EHE |

Abb. 50: Konservierte Sequenzmotive in den Proteinlinkerbereichen der verschiedenen Domänen von *Haliotis tuberculata*, *Octopus dofleini*, *Nucula nucleus* und *Nautilus pompilius*.

Hochkonservierte Sequenzen sind grau hinterlegt. Die dazu gehörigen Sekundärstrukturen sind entsprechend ihrer Position in OdH-g vermerkt. Um die Sequenzen alignieren zu können, wurden an manchen Stellen Lücken eingefügt, deren Position allerdings nicht genau definiert ist.

Neben den Linkerintrons treten auch interne Introns auf, die Beispiele für die ‚intron-late‘-Hypothese sind (Lieb et al., 2001). Dieser zweite Typ von Introns befindet sich innerhalb einer funktionellen Domäne und ist im Gegensatz zu den Linkerintrons variabel in Lage und Phase. Auch die Anzahl an internen Introns ist bei den verschiedenen Mollusken-Hämocyanin-Genen unterschiedlich. In **Abb. 51** ist die Genstruktur der schon die bekannten Hämocyanine von den *Haliothis tuberculata*, *Megathura crenulata* und *Octopus dofleini* im Vergleich zu den Genen von NpH und NnH dargestellt.

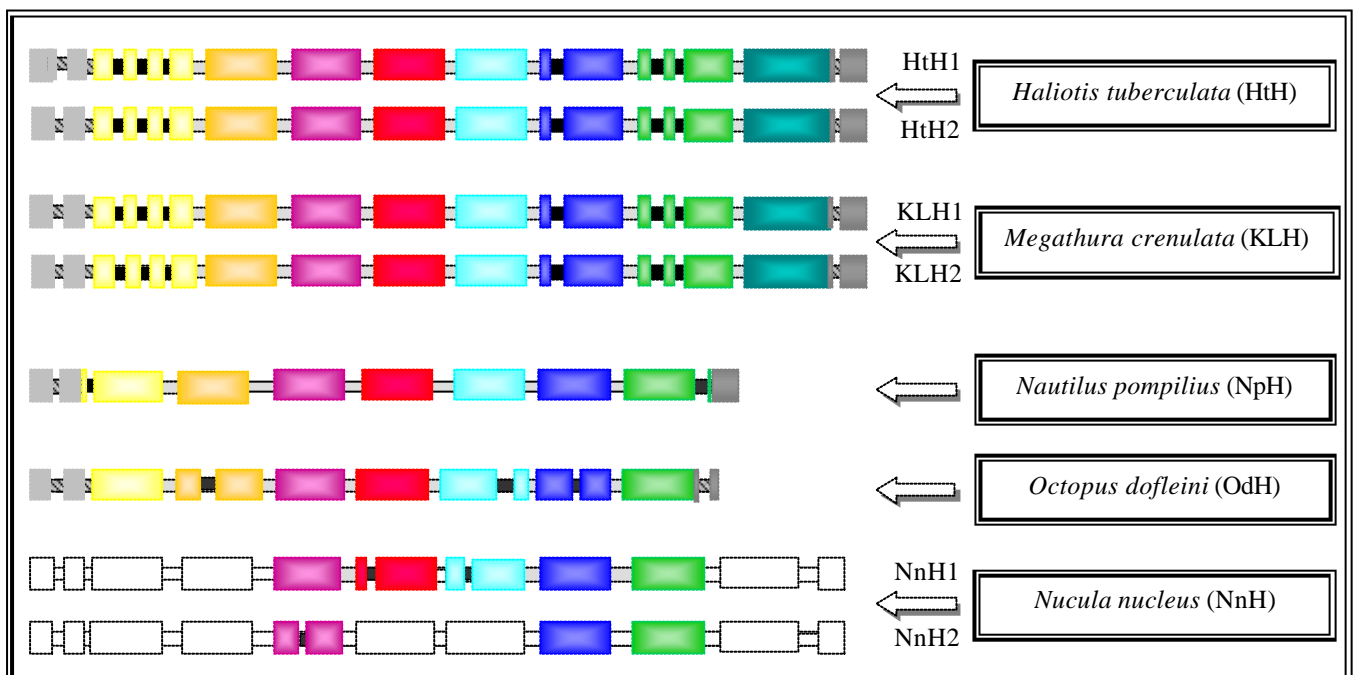


Abb. 51: Genstruktur des Hämocyanins bei verschiedenen Mollusken-Klassen.

Die Domänen sind mit den bisher verwendeten Farben unterschiedlich gekennzeichnet, wobei die auf genomischer Ebene noch nicht sequenzierten Domänen farblos dargestellt sind. Interne Introns sind schwarz, Linkerintrons grau markiert. Aufgrund ihrer ungewissen Herkunft sind Introns innerhalb des Signalpeptids und der 3'UTR schwarz-grau gestreift dargestellt. Die Länge der Introns wurde in dieser Grafik nicht berücksichtigt. Die Position der internen Introns entspricht in etwa der Lage in der Domäne.

Neben den Linkerintrons und den internen Introns gibt es einen dritten Typ von Introns. Diese befinden sich innerhalb des Signalpeptids, zwischen dem Signalpeptid und FU-*a* sowie innerhalb des 3'UTR (siehe **Abb. 51**). Je nach Hypothese, wie die Hämocyanin-Untereinheit entstanden sein könnte, wird dieser Intron-Typ entweder zu den Linkerintrons oder zu den internen Introns gezählt. Dieser Punkt wird in Kapitel D 4.3 vertieft.

Bei den Schnecken *Haliothis tuberculata* und *Megathura crenulata* tragen nicht nur beide Hämocyanin-Isoformen jeweils die gleichen internen Introns, ihre Position ist auch interspezifisch konserviert - beide Schnecken gehören zur Überordnung Vetigastropoda.

Jedoch gibt es weder zwischen den verschiedenen Mollusken-Klassen noch zwischen den verschiedenen Domänen eine Übereinstimmung interner Introns. Das schließt ein konserviertes internes Intron der ‚Ursprungsdomäne‘ aus, wie es beispielsweise für das Hämoglobin von *Artemia* angenommen wird (Jellie et al., 1996). Somit müsste sich die Insertion der internen Introns nach der Trennung der Klassen, aber vor der Separation der Überordnungen ereignet haben. Auf die Besonderheiten in der Genstruktur von *Nucula nucleus* und *Nautilus pompilius* wird nun im Folgenden genauer eingegangen.

4.1 *Nucula nucleus*

Obwohl konserviert in Phase und Position (siehe **Abb. 50**) ist die Länge der Linkerintrons variabel; sie liegt zwischen ~ 424 bp (NnH1-*f/g*) und ~ 2160 bp (NnH1-*e/f*). Ähnliche Größenunterschiede weisen auch Gastropoden-Hämocyanin-Gene auf (Altenhein et al., 2002). Die drei internen Introns befinden sich alle im Bereich der ersten Kupferbindungsstelle. Allerdings liegt bei NnH1-*c* im Gegensatz zu NnH2-*c* kein internes Intron vor. Phylogenetisch kommen hierfür zwei Möglichkeiten in Betracht. Einerseits wäre eine Insertion dieses Introns nach Entstehung der beiden Isoformen denkbar. Andererseits könnte es bereits vor der Duplikation vorhanden gewesen und danach in NnH1 verloren gegangen sein. Letztere Vermutung ist jedoch weniger wahrscheinlich, da hier zwei Schritte - erst Insertion, dann Deletion - notwendig gewesen wären, im Vergleich zu einem einzigen Insertionsereignis bei der ersten Hypothese. Der ‚umständliche‘ Weg wäre vorstellbar, wenn dieses Intron sehr ursprünglich wäre. Diese Situation wurde bei zwei Kopien des Ratten-Insulingens gefunden, bei der die eine über ein zusätzliches Intron verfügt, welches bei der zweiten verloren gegangen ist (Perler et al., 1980). Im Fall des Hämocyanins passt so etwas aber weniger gut zum ‚intron-late‘-Szenario. Die in NnH1-*d* und NnH1-*e* liegenden internen Introns konnten in den entsprechenden Domänen von NnH2 bisher nicht nachgewiesen werden. Schwierigkeiten bei der Amplifikation in diesem Sequenzbereich sprechen allerdings für die Existenz interner Introns, da repetitive Intronsequenzen häufig solche Probleme bereiteten.

4.2 *Nautilus pompilius*

Das Hämocyanin-Gen von *Nautilus pompilius* gleicht im Aufbau grundlegend der bereits bekannten Genstrukturen von *Haliothis tuberculata* und *Octopus dofleini* (Lieb et al., 2001). Die Länge der Linkerintrons liegt beim *Nautilus*-Hämocyanin-Gen zwischen 200 bp und

500 bp. Damit entsprechen diese von der Größe den Linkerintrons im *Octopus*-Hämocyanin-Gen (Lieb et al., 2001). Das Intron im Signalpeptid des NpH-Gens ist das einzige in Phase 0, was mit den korrespondierenden internen Introns anderer Hämocyanin-Gene übereinstimmt. Im Gegensatz zu den Hämocyanin-Genstrukturen anderer Mollusken sind das Signalpeptid und NpH-*a* nicht durch ein Intron getrennt; dagegen liegt ein Intron 10 bp *downstream* des Beginns von NpH-*a* vor. Ungewöhnlicherweise gibt es kein Intron in der 3'UTR, während dieses in den Genen vom *Octopus*-Hämocyanin und *Haliotis*-Hämocyanin vorkommt. Es liegt dort bei beiden in Phase 1 vor und befindet sich wenige Basenpaare *downstream* des Stopcodons (Lieb et al., 2001). Jedoch liegt ein internes Intron 12 bp *upstream* des Stopcodons in NpH-*g*. Auffällig an der Genstruktur des *Nautilus pompilius*-Hämocyanins ist die randständige und fast spiegelbildliche Lage der internen Introns am N- und C-Terminus. Diese Besonderheit beim NpH-Gen wirft die Frage nach der Herkunft dieser Introns auf. Einerseits könnten beide Introns anfänglich aus dem Signalpeptid bzw. aus dem 3'UTR wie bei den anderen Mollusken-Hämocyaninen stammen und durch Intron-sliding verschoben worden sein. Andererseits könnte es sich um ursprüngliche Linkerintrons handeln; das erste befand sich zwischen dem Signalpeptid und NpH-*a* und das zweite zwischen NpH-*g* und NpH-*h* vor dem Verlust der letzteren. Interessanterweise sind sowohl NpH-*a* als auch NpH-*g* wenige Aminosäuren länger als HtH1-*a* bzw. HtH1-*g* (ebenso bei HtH2; Altenhein et al., 2002). Damit entspricht die Lage der internen Introns im *Nautilus*-Hämocyanin-Gen exakt den Positionen der Introns zwischen HtH1-*s*₂ und HtH1-*a* bzw. zwischen HtH1-*g* und HtH1-*h*. Diese Beobachtung wird in Kapitel D 4.3 eingehender diskutiert und in Zusammenhang mit den dort aufgeführten Hypothesen gestellt.

Ausgehend von dem ‚intron-late‘-Szenario für die internen Introns wäre das Exon-Intron-Muster des *Nautilus*-Hämocyanin-Gens ein sehr ursprüngliches. So stehen den konservierten Linkerintrons zwei für NpH eigentümliche interne Introns gegenüber, die entsprechend der ‚Hypothese der ursprünglichen Linkerintrons‘ möglicherweise auch sehr alt sind. Das wäre erstaunlich, da man bei den so genannten ‚lebenden Fossilien‘ davon ausgeht, dass nur ihre Morphologie, nicht aber ihre Makromoleküle in der Zeit eingefroren sind.

4.3 Rückschlüsse auf die Entstehung der Hämocyanin-Untereinheit

Anhand der Genstruktur von NpH und den anderen Hämocyaninen lassen sich Hypothesen zur Entstehung der Untereinheit formulieren. Diese orientieren sich an folgenden Fragen: Wie sah die ursprüngliche Monodomäne aus, wenn die funktionellen Domänen in Phase 1 beginnen und aufhören? Wieso liegt eine Unregelmäßigkeit in der Phase des Introns innerhalb

des 3'UTRs vor? Wie kommen die unterschiedlichen Domänenüberhänge in FU-*a* und zum Teil in FU-*g* mit jeweils vier Aminosäuren sowie FU-*h* mit 100 Aminosäuren zustande? Und letztlich, wie fügt sich die Genstruktur vom *Nautilus pompilius*-Hämocyanin in das bisherige Bild der Hämocyanin-Evolution ein?

Die Vorstellung von der Ur-Domäne orientierte sich vor allem an den wiederkehrenden Elementen in der Hämocyanin-Genstruktur. Die erste Überlegung konzentrierte sich auf die Frage, ob das Signalpeptid bereits in der Ur-Domäne vorhanden war oder erst an die Acht-Domänen-Untereinheit angefügt wurde. Ein Vergleich mit anderen Typ-3 Kupferproteinen zeigte eine große Varianz in deren Struktur. So besitzen die Tyrosinasen der Tiere ein Signalpeptid, während jene der Pflanzen über ein Transitpeptid verfügen. Bei Tyrosinasen von Bakterien fehlt diese N-terminale Sequenz natürlich (van Gelder et al., 1997; Gerdemann et al., 2002). Geht man nun von einem bakteriellen Typ-3 Kupferprotein als Ursprung aus, fehlte hier wahrscheinlich ein ‚Transportsignal‘. Erst innerhalb der eukaryotischen Zelle erfolgte das Anfügen eines Signalpeptids an die Ur-Domäne, weil nun eine gezielte Lokalisierung notwendig wurde. Diese Entwicklung passt zu den Beobachtungen bei Tyrosinasen. Danach wäre das Signalpeptid vor den Duplikationsprozessen bereits vorhanden gewesen. Die zweite Möglichkeit ist, dass das Signalpeptid erst an die rezente Acht-Domänen-Untereinheit angefügt wurde. Dafür gibt es allerdings keine Hinweise. Der weiteren Diskussion wird eine Ur-Domäne mit Signalpeptid zugrunde gelegt.

Vergleicht man nun die Signalpeptide der bekannten Hämocyanine miteinander, so sind diese immer durch ein Intron in Phase 0 in zwei Exons s_1 und s_2 getrennt (**Abb. 52**). Es ist nicht klar, ob ursprünglich beide Exons zum Signalpeptid gehörten oder s_2 Bestandteil der Monodomäne war. In letzterem Fall umfasst s_2 möglicherweise die späteren Linkerpeptide. Zur besseren Trennung der beiden Bereiche sind diese in **Abb. 52** unterschiedlich markiert. Möglicherweise war die Ur-Domäne größer als die der rezenten Domänen im Hämocyanin. Die Ur-Domäne endete mit einem Stopcodon, auf das die 3'UTR folgte.

Basierend auf der in **Abb. 52** skizzierten Ur-Domäne stelle ich hier zwei Hypothesen vor (**Abb. 53** und **Abb. 54**), welche die Evolution der Untereinheit des Mollusken-Hämocyanins erklären könnten.

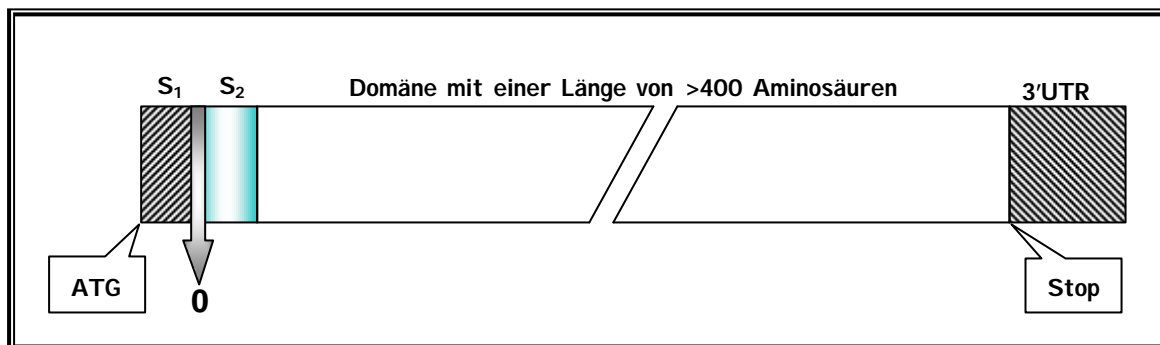


Abb. 52: Schematische Darstellung der hypothetischen Ur-Domäne.

Der Aufbau ergab sich aus Überlegungen basierend auf den bisher zur Verfügung stehenden Daten. Die Ur-Domäne besteht aus drei Teilen, dem Signalpeptid, der Domäne und einer 3'UTR. Das Signalpeptid ist in s_1 und s_2 durch ein Intron in Phase 0 getrennt, wie es bisher bei allen bekannten Hämocyaninen gefunden wurde. Diese Bezeichnung wurde zur besseren Zuordnung in der späteren Hämocyanin-Untereinheit verwendet. Ob s_2 ursprünglich ein Bestandteil des Signalpeptids oder der Domäne war, ist unklar. In dieser Hypothese wird davon ausgegangen, dass die Länge der Ur-Domäne größer als die der späteren Domäne im Hämocyanin war. Die Länge der dargestellten Bereiche entspricht nicht ihrem tatsächlichen Verhältnis zueinander, da vor allem der mittlere Teil wesentlich größer sein müsste (durch eine Unterbrechung in diesem Bereich angedeutet).

Die erste Hypothese (**Abb. 53**) beginnt mit der Insertion eines Introns in Phase 1 in der hinteren Region der Domäne (①). Der Bereich zwischen dem Intron im Signalpeptid und dem innerhalb der Domäne wurde im Anschluss dupliziert. Aus dieser Duplikation mit anschließender Fusion resultierte allerdings ein Leserastersprung aufgrund des unvollständigen Codons am Ende der ersten Domäne (②). Um die Funktionsfähigkeit des Proteins zu erhalten, musste dieser Fehler durch Intron-sliding behoben werden. Dabei verschob sich die Intron-grenze um ein Nukleotid nach rechts, so dass die beiden Exons durch ein Intron in Phase 1 getrennt wurden (③). Der Prozess des Intron-slidings konnte bereits in Genstudien nachgewiesen werden (Rogozin et al., 2000; Sakharkar et al., 2001).

Für den weiteren Verlauf ergeben sich zwei Möglichkeiten (④ und ⑤-⑦): Zum einen konnten die beiden entstandenen Exons nun als duplizierende Einheit fungieren, woraus ein Vier-Domänen-Fragment hervorgegangen wäre, welches wiederum nach dessen Duplikation die Acht-Domänen-Untereinheit geformt hätte (④). Dabei muss man allerdings beachten, dass sich jeweils bei der Fusion zwischen Duplikationsmatrize und dupliziertem Fragment ein Intron-sliding wie in der oben beschriebenen Weise ereignet haben müsste.

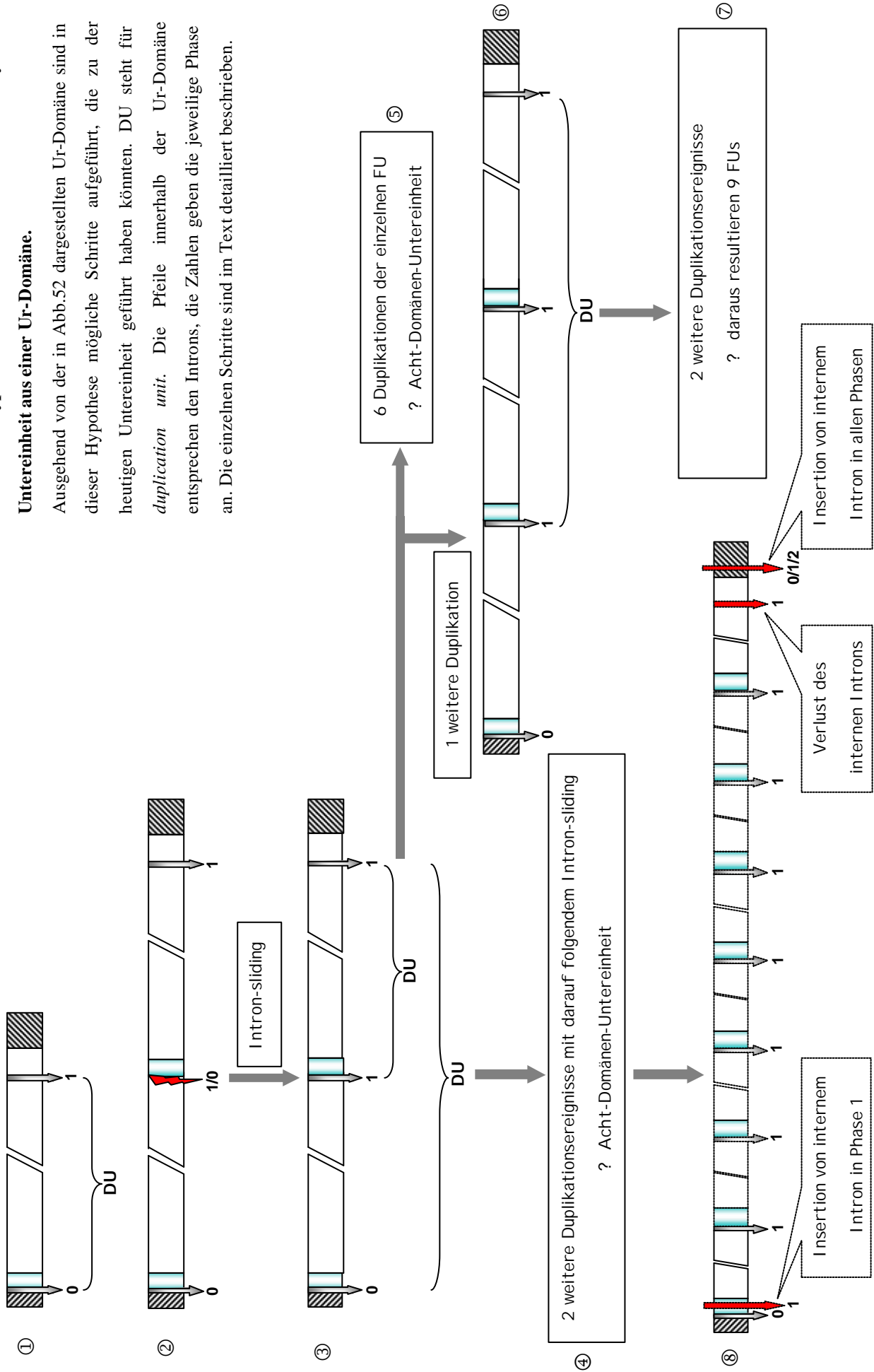
Zum anderen konnte die neu entstandene Domäne als duplizierende Einheit dienen, wobei hinsichtlich der Anzahl dieses Ereignisses verschiedene Varianten möglich sind. Entweder führten sechs einzelne Duplikationen zu der Acht-Domänen-Untereinheit (⑤), oder aber es ereignete sich zunächst eine weitere Duplikation (⑥), nach der die 2. und 3. Domäne in zwei

weiteren Ereignissen dupliziert wurden. Daraus resultierte ein Neun-Domänen-Fragment (⑦), wobei die C-terminale Domäne zum Teil verloren ging. Deren Überreste könnten die Extension der *FU-h* darstellen, was allerdings aufgrund der großen Sequenzunterschiede wenig wahrscheinlich ist.

Um der Grundstruktur der Hämocyanin-Untereinheit zu entsprechen, waren nun drei weitere Prozesse in dem Acht-Domänen-Fragment notwendig (⑧). Zum einen müsste ein Intron in Phase 1 in die s_2 -Region der ersten Domäne inseriert worden sein, wie es zu Beginn von *FU-a* der Hämocyanine gefunden wird. Greift man an dieser Stelle die Linkerpeptide nochmals auf, so würde die Intron-Insertion das verkürzte Linkerpeptid in *FU-a* erklären. Daneben ist von einem Verlust des internen Introns in der achten Domäne auszugehen, da hier kein konserviertes Intron bei den verschiedenen Hämocyaninen vorliegt. Zudem müsste eine Insertion von einem Intron in die 3'UTR erfolgt sein, da an dieser Position mit Ausnahme von *NpH* in allen Hämocyaninen ein Intron vorkommt. Im Unterschied zu den bisherigen Introns ist dieses nicht an eine Phase gebunden, da hier eine Phasenverschiebung ohne Auswirkung bleibt.

Abb. 53: Hypothese 1 zur Evolution der Hämocyanin-Untereinheit aus einer Ur-Domäne.

Ausgehend von der in Abb.52 dargestellten Ur-Domäne sind in dieser Hypothese mögliche Schritte aufgeführt, die zu der heutigen Untereinheit geführt haben könnten. DU steht für *duplication unit*. Die Pfeile innerhalb der Ur-Domäne entsprechen den Introns, die Zahlen geben die jeweilige Phase an. Die einzelnen Schritte sind im Text detailliert beschrieben.



Wie man in **Abb. 53** sehen kann, erfordert Hypothese 1 sehr viele Einzelereignisse. Daher schlage ich Hypothese 2 vor, die wesentlich weniger Duplikationsschritte benötigt (**Abb. 54**).

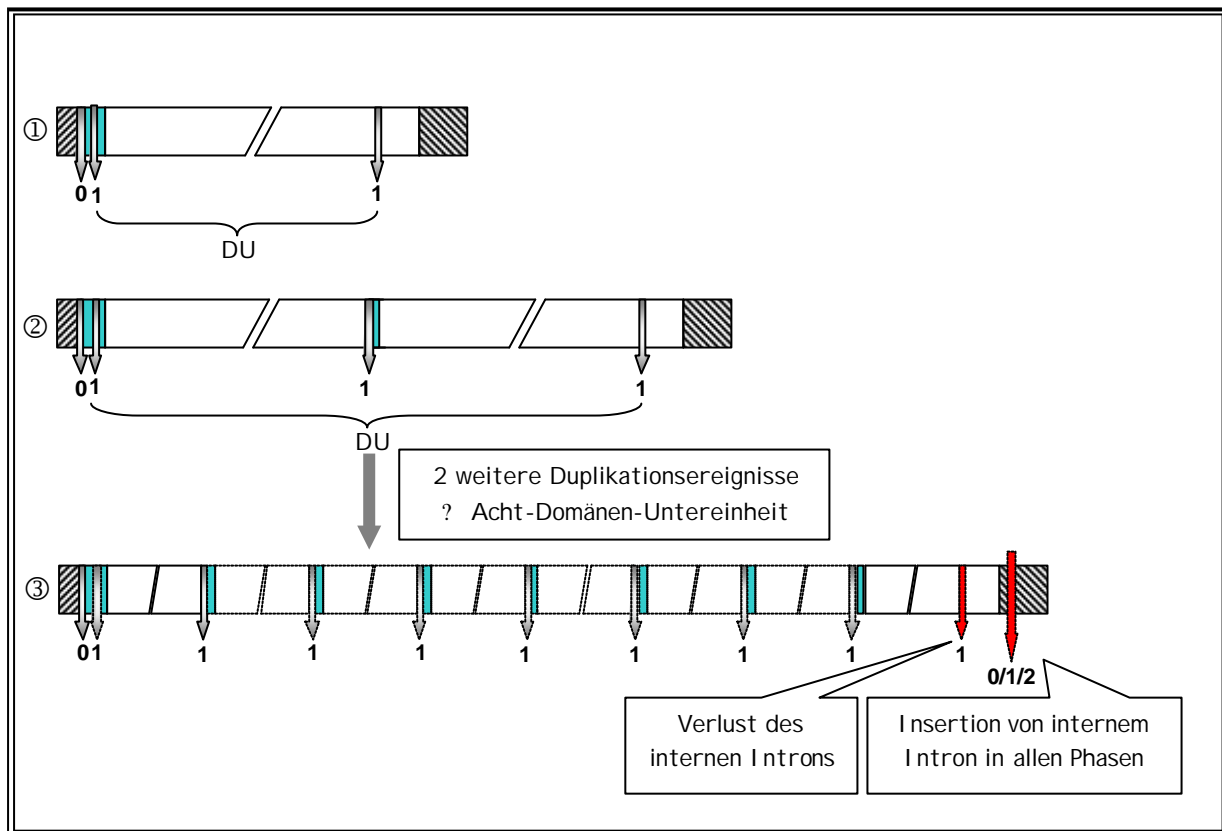


Abb. 54: Hypothese 2 zur Evolution der Hämocyanin-Untereinheit aus einer Ur-Domäne.

Ausgehend von der in **Abb. 52** dargestellten Ur-Domäne ist hier ein alternativer Ablauf der Duplikationsereignisse aufgeführt, die zur Acht-Domänen-Untereinheit geführt haben könnten. Im Unterschied zu der in **Abb. 53** beschriebenen Abfolge beginnt diese hier mit der Insertion von zwei Introns, welche die ‚duplication unit‘ (DU) umschließen. Die Introns sind als Pfeile innerhalb der Ur-Domäne dargestellt, die Zahlen geben die jeweilige Phase an. Die einzelnen Schritte sind im Text detailliert geschildert.

Der Unterschied der zweiten Hypothese liegt in der Insertion von zwei Introns in die ursprüngliche Monodomäne (①). Die Lage des C-terminalen Introns bleibt wie in **Abb. 53** gleich. Das zweite N-terminale Intron fügte sich innerhalb des s_2 -Bereichs ein. Beide Introns liegen in Phase 1 vor und umfassen die Region, die als duplizierende Einheit (DU) bezeichnet wird. Nach Duplikation und Fusion der Domänen (②) schlossen sich diese zur DU zusammen, woraus ein Vier-Domänen-Fragment entstand. Dieses wiederum diente als Duplikationsmatrize und führte letztlich zur Acht-Domänen-Untereinheit (③). Auch in Hypothese 2 war als Anpassung an die Hämocyanin-Untereinheit zum einen der Verlust des internen Introns in *FU-h*, zum anderen die Insertion des internen Introns im 3'UTR notwendig. Die durch die symmetrische Insertion der Introns entstandene DU hat den Vorteil,

dass es zu keiner Leserasterverschiebung kommt. Schon in früheren Untersuchungen wurde eine Korrelation zwischen Intron-Phasen beobachtet, die zu symmetrischen Exons führten (Long et al., 1995a; 1995b).

Anhand beider Hypothesen wird deutlich, warum in Kapitel 4 neben den Linkerintrons und den internen Introns ein dritter Typ von Introns unterschieden wird. Das Intron zwischen s_2 und FU-*a* und das Intron im 3'UTR sind danach genau genommen interne Introns, die allerdings wesentlich früher inseriert wurden und in ihrer Position im Vergleich zu den anderen internen Introns konservierter sind.

Natürlich lassen beide hypothetischen Evolutionswege Fragen offen. Im Gegensatz zu Hypothese 1 erklärt die zweite nicht, warum der Beginn von FU-*a* wesentlich kürzer als das der anderen Domänen ist. Vielmehr wird von einem ursprünglich kurzen Linkerpeptid ausgegangen, dessen unterschiedliche Länge in den einzelnen Domänen möglicherweise durch Rekombination und Fusion entstanden ist. Diese Ereignisse spielen wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Entstehung des C-terminalen Überhangs von vier Aminosäuren in FU-*a* bei allen Hämocyaninen und in FU-*g* bei den Cephalopoden. Für die Extension in FU-*h* bieten die Hypothesen zwei Erklärungsansätze. Neben dem Vorschlag als Überreste einer 9. Domäne erscheint die Vorstellung überzeugender, dass die Extension bereits in der Ur-Domäne vorhanden war, was in den Abbildungen dem Bereich zwischen dem C-terminalen Intron und der 3'UTR entspricht. Das würde für FU-*h* als Ur-Domäne sprechen. Diese Hypothese wurde bereits aufgrund struktureller Überlegungen formuliert (Lieb et al., 2001).

Während die beiden Hypothesen die Genstruktur der Hämocyanine von *Haliothis tuberculata*, *Megathura crenulata* und *Octopus dofleini* erklären können, lässt die Abweichung der Genstruktur vom *Nautilus pompilius*-Hämocyanin Fragen offen. Es ist unklar, welcher Typ von Genstruktur - der von NpH auf der einen und die von HtH, KLH und OdH auf der anderen Seite - die ursprüngliche Form darstellt. Zwar scheint NpH aufgrund der geringen Anzahl an internen Introns und deren Position sehr ursprünglich zu sein. Jedoch ist unwahrscheinlich, dass sich die Genstruktur von HtH, KLH und OdH bezüglich der Introns zwischen s_2 und FU-*a* sowie innerhalb der 3'UTR unabhängig voneinander gleich entwickelt hat. Für die Übereinstimmung des Introns zwischen s_2 und FU-*a* bei beiden Gen-Typen spricht die Konservierung in Position und Phase. Wäre s_2 erst nach der Duplikation ein Teil des Signalpeptids geworden, hätte sich die Grenze zwischen s_2 und FU-*a* bei NpH um drei Aminosäuren *downstream* verlagert. Eine Verschiebung von Introns wurde auch beim Hämoglobin von *Artemia* (Jellie et al., 1996) und bei der Pyruvat-Kinase vom Huhn (Roy, 2003) beobachtet. Wie in Kapitel D 4.2 erwähnt, könnte es sich bei dem Intron in NpH-*g* um das ursprüngliche Linkerintron zwischen FU-*g* und FU-*h* handeln. Bei OdH wäre dieses

verloren gegangen und ein neues Intron in der 3'UTR eingefügt worden; oder es war in der 3'UTR von NpH ein Intron vorhanden, was später verloren ging. Letzteres würde für die Ursprünglichkeit dieses Introns sprechen und somit erklären, warum ebenso in HtH ein Intron an dieser Position vorhanden ist.

Abschließend bleibt die Frage nach der Ur-Domäne. Wie in Kapitel 5 zu sehen sein wird, lässt sich anhand der Sequenzanalyse keine Aussage über die Reihenfolge der Duplikationsereignisse treffen. Dieser Punkt wird dort genauer diskutiert.

5. Evolution der Mollusken-Hämocyanine

Für phylogenetische Analysen wurden neben den neuen Hämocyanin-Sequenzen nur vollständig sequenzierte funktionelle Domänen verschiedener Mollusken-Hämocyanine verwendet, die in **Tab. 8** aufgeführt sind. Diese Sequenzdaten sind unter den angegebenen Accession-Nummern zu finden. Bisher unveröffentlichte Sequenzen sind aus unserem Arbeitskreis, mit Ausnahme der Sequenzen von *Sepia officinalis*, die aus der Arbeitsgruppe von Prof. Préaux (Katholische Universität Leuven, Belgien) stammen.

| | | |
|-----------------------------------|---------------|-------------------------|
| Gastropoda | | |
| <i>Haliotis tuberculata</i> | HtH1-a bis -h | Accession-Nr. Y 13216 |
| | HtH2-a bis -h | Accession-Nr. AJ 012048 |
| <i>Megathura crenulata</i> | KLH1-a bis -h | bisher unveröffentlicht |
| | KLH2-a bis -h | bisher unveröffentlicht |
| <i>Rapana thomasiana</i> | RtH2-e | Accession-Nr. P 83040 |
| <i>Aplysia californica</i> | AcH1-a bis -h | Accession-Nr. AJ 556169 |
| <i>Helix aspersa</i> | HaH-d | bisher unveröffentlicht |
| <i>Helix pomatia</i> | HpH-g | Accession-Nr. P 56823 |
| Cephalopoda | | |
| <i>Octopus dofleini</i> | OdH-a bis -g | Accession-Nr. O 61363 |
| <i>Sepia officinalis</i> | SoH1-a bis -g | bisher unveröffentlicht |
| | SoH2-a bis -g | bisher unveröffentlicht |
| <i>Nautilus pompilius</i> | NpH-a bis -g | Accession-Nr. AJ 619741 |
| Bivalvia | | |
| <i>Nucula nucleus</i> | NnH1-a bis -h | Accession-Nr. AJ786639 |
| | NnH2-a bis -h | Accession-Nr. AJ786640 |
| Polyplacophora | | |
| <i>Acanthochiton fascicularis</i> | AfH-g | bisher unveröffentlicht |
| <i>Lepidochiton cinereus</i> | LcH-f | bisher unveröffentlicht |

Tab. 8: Auflistung der vollständig sequenzierten Domänen von Mollusken-Hämocyaninen und gegebenenfalls deren Accession-Nummer.

Bisher unveröffentlichte Sequenzen stammen aus unserem Arbeitskreis, mit Ausnahme der Sequenzen von *Sepia officinalis* (Arbeitsgruppe von Prof. Préaux, Katholische Universität Leuven, Belgien).

Um die Primärsequenzen der Hämocyanine von *Nucula nucleus*, *Nautilus pompilius*, *Octopus dofleini* und *Haliotis tuberculata* gegenüberzustellen, wurden mittels des Programms ClustalX die einzelnen funktionellen Domänen paarweise miteinander verglichen und daraus ihre Identität prozentual berechnet. Das Ergebnis ist in **Tab. 9** zusammengefasst.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|-------|-------|
| 100 | 56 | 53 | 53 | 51 | 42 | 42 | 41 | 38 | 40 | 41 | 42 | 43 | 43 | 42 | 43 | 44 | 42 | 43 | 41 | 42 | 43 | 43 | 42 | 43 | 44 | 42 | 43 | 39 | 40 | HtH1a | | |
| 100 | 61 | 53 | 54 | 43 | 44 | 44 | 43 | 43 | 42 | 44 | 42 | 44 | 44 | 44 | 47 | 44 | 41 | 42 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 46 | 38 | 40 | NnH1a | |
| 100 | 51 | 49 | 49 | 42 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 39 | 39 | 40 | 41 | 41 | 41 | 41 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 37 | 39 | NnH2a | |
| 100 | 60 | 50 | 50 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 38 | 40 | NpHa | | |
| 100 | 58 | 57 | 55 | 45 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 37 | 38 | OdHa | | |
| 100 | 62 | 56 | 56 | 57 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 40 | 42 | HtH1b | | |
| 100 | 62 | 56 | 56 | 60 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 41 | 42 | NnH1b | | |
| 100 | 50 | 50 | 50 | 56 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | NnH2b | | |
| 100 | 59 | 59 | 59 | 59 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 38 | 39 | NpHb | | |
| 100 | 56 | 52 | 54 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 41 | 41 | OdHb | | |
| 100 | 55 | 52 | 54 | 54 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | HtH1c | |
| 100 | 47 | 47 | 47 | 47 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | NnH1c | |
| 100 | 57 | 50 | 49 | 49 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 41 | 41 | NnH2c | | |
| 100 | 47 | 47 | 47 | 47 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | NpHc | |
| 100 | 56 | 52 | 54 | 54 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | OdHc | |
| 100 | 62 | 59 | 58 | 53 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | HtH1d | |
| 100 | 72 | 56 | 51 | 51 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | NnH1d | |
| 100 | 57 | 52 | 52 | 52 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | NnH2d | |
| 100 | 67 | 67 | 67 | 67 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | NpHd | |
| 100 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | OdHd | |
| 100 | 56 | 55 | 52 | 52 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | HtH1e | |
| 100 | 61 | 51 | 52 | 52 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | NnH1e | |
| 100 | 53 | 52 | 52 | 52 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | NnH2e | |
| 100 | 59 | 59 | 59 | 59 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | NpHe | |
| 100 | 54 | 54 | 54 | 54 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | OdHe | |
| 100 | 64 | 53 | 50 | 50 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | HtH1f | |
| 100 | 56 | 53 | 53 | 53 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | NnH1f | |
| 100 | 56 | 53 | 53 | 53 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | NnH2f | |
| 100 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | NpHf | |
| 100 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | 46 | OdHf | |
| 100 | 63 | 59 | 58 | 58 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | 41 | HtH1g | |
| 100 | 67 | 58 | 56 | 56 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | NnH1g | |
| 100 | 58 | 55 | 55 | 55 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | NnH2g | |
| 100 | 63 | 63 | 63 | 63 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | NpHg |
| 100 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | OdHg |
| 100 | 51 | 46 | 46 | 46 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | HtH1h |
| 100 | 57 | 46 | 46 | 46 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | NnH1h |
| 100 | 57 | 46 | 46 | 46 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | NnH2h |

Tab. 9: Identitäten (%) der Aminosäuresequenzen der funktionellen Domänen von *Nucula nucleus* (NnH), *Nautilus pompilius* (NpH), *Haliotis tuberculata* (HtH) und *Octopus doffleini* (OdH).

- Sequenzidentität zwischen korrespondierenden FUs von NnH1 und NnH2
 - Sequenzidentität zwischen nicht-korrespondierenden FUs von NnH1 und NnH2
 - Sequenzidentität zwischen korrespondierenden FUs von NnH1/ NnH2 und HtH1
 - Sequenzidentität zwischen korrespondierenden FUs von NpH und OdH
 - Sequenzidentität der nicht-korrespondierenden FUs von NpH
 - Sequenzidentität zwischen korrespondierenden FUs von NpH und HtH1
- Korrespondierende FUs sind **fett** markiert.

(**Abb. 56**) verwendet. Beiden Verfahren wurde eine PAM-Matrix zugrunde gelegt. Zur Erstellung der phylogenetischen Bäume wurden neben den Hämocyanin-Sequenzen von *Nucula nucleus* und *Nautilus pompilius* alle vollständig sequenzierte Domänen der in **Tab. 8** aufgeführten Mollusken verwendet. Die editierten Sequenzen der einzelnen Domänen wurden in einer der Analysen ungekürzt verwendet, eine zweite Berechnung wurde mit Domänen durchgeführt, von denen die hochvariablen Linkerbereiche entfernt worden waren. Die aus diesen beiden Sequenzvorlagen resultierenden Stammbäume zeigten hinsichtlich ihrer Anordnung eine vollständige Übereinstimmung und unterschieden sich lediglich durch bessere Unterstützungswerte bei Entfernung der Linkersequenzen. Daher sind an dieser Stelle nur die beiden Stammbäume mit den FUs ohne Linkerbereiche dargestellt.

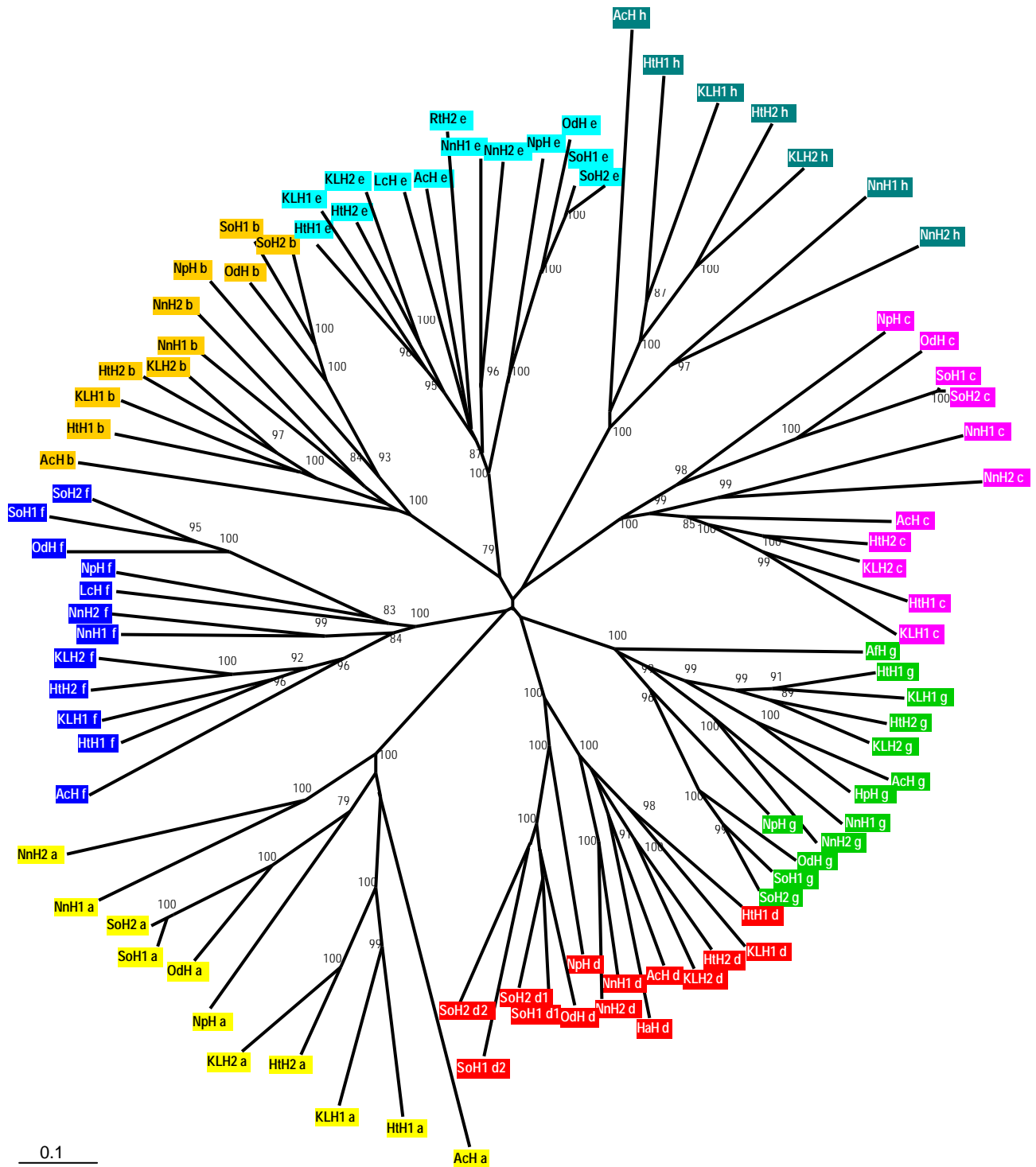


Abb. 55: Radialer Stammbaum der bisher vollständig sequenzierten funktionellen Domänen diverser Mollusken-Hämocyanine (Neighbor-joining).

Der Stammbaum wurde mit der Neighbor-joining-Methode berechnet, dem eine PAM-Matrix zugrunde gelegt wurde. An den Ästen sind die ‚Bootstrap‘-Werte aufgeführt, die eine statistische Absicherung liefern (Werte unter 75 wurden weggelassen). Die topologisch äquivalenten Domänen sind jeweils in gleicher Farbe gekennzeichnet.

NnH1/2, *Nucula nucleus* Hämocyanin; NpH, *Nautilus pompilius* Hämocyanin; OdH, *Octopus dofleini* Hämocyanin; SoH1/2, *Sepia officinalis* Hämocyanin; HtH1/2, *Haliotis tuberculata* Hämocyanin; KLH1/2, *Megathura crenulata* Hämocyanin; AcH1/2, *Aplysia californica* Hämocyanin; HaH, *Helix aspersa* Hämocyanin; HpH, *Helix pomatia* Hämocyanin; RtH2, *Rapana thomasi* Hämocyanin; LcH, *Lepidochiton cinereus* Hämocyanin; AfH, *Acanthochiton fascicularis* Hämocyanin.

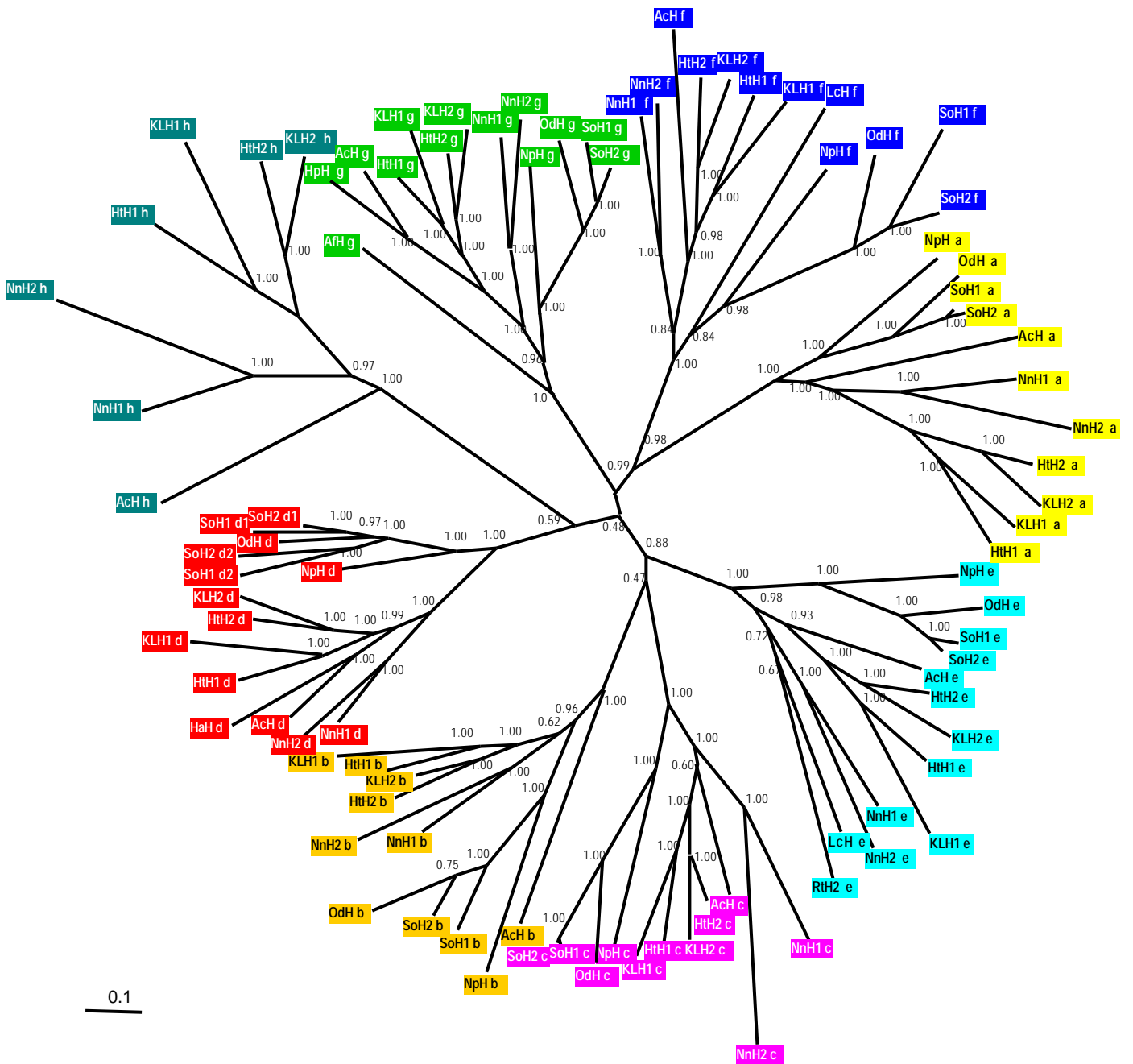


Abb. 56: Radialer Stammbaum der bisher vollständig sequenzierten funktionellen Domänen des Mollusken-Hämocyanins (MrBayes).

Der Stammbaum wurde mit MrBayes berechnet, dem eine PAM-Matrix zugrunde gelegt wurde. An den Ästen sind die ‚Wahrscheinlichkeits‘-Werte aufgeführt, die eine statistische Absicherung liefern. Die topologisch äquivalenten Domänen sind jeweils in gleicher Farbe gekennzeichnet.

NnH1/2, *Nucula nucleus* Hämocyanin; NpH, *Nautilus pompilius* Hämocyanin; OdH, *Octopus dofleini* Hämocyanin; SoH1/2, *Sepia officinalis* Hämocyanin; HtH1/2, *Haliotis tuberculata* Hämocyanin; KLH1/2, *Megathura crenulata* Hämocyanin; AcH1/2, *Aplysia californica* Hämocyanin; HaH, *Helix aspersa* Hämocyanin; HpH, *Helix pomatia* Hämocyanin; RtH2, *Rapana thomasiana* Hämocyanin; LcH, *Lepidochiton cinereus* Hämocyanin; AfH, *Acanthochiton fascicularis* Hämocyanin

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, besteht zwischen dem Mollusken-Hämocyanin und den Enzymen Tyrosinase (van Gelder et al., 1997) und Catechol-Oxidase (Klabunde et al., 1998) eine enge phylogenetische Verwandtschaft. Diese spiegelt sich im ähnlichen Aufbau des aktiven Zentrums und der schwachen Phenol-Oxidase-Aktivität der Mollusken-Hämocyanine wieder (Salvato et al., 1998). Allerdings ist diese Verwandtschaft auf Ebene der Primärstruktur so weit entfernt, dass diese Enzyme aufgrund der mangelnden Auflösung nicht als Außengruppe dienen können. Aus diesem Grund wurde die ungewurzelte Darstellung in **Abb. 55** und **Abb. 56** verwendet. Beide Stammbäume zeigen acht stabile Äste, welche die acht funktionellen Domänen repräsentieren. Diese Anordnung stützt die Hypothese einer ancestralen Domäne (Miller et al., 1998), wie es auch bei dem Vergleich der Sequenzidentitäten beobachtet wurde (siehe **Tab. 9**). Theoretischen Überlegungen zufolge ging die Acht-Domänen-Untereinheit aus drei Duplikationsschritten mit anschließender Genfusion hervor (Markl et al., 2001; Lieb et al., 2001). Diese Hypothese konnte allerdings nicht überprüft werden, da die Anordnung der Äste entweder sehr schlecht unterstützt ist und/oder bei Verwendung verschiedener Analysemethoden variierte. Auch die Anordnung der Mollusken-Klassen zueinander ist nicht zu entnehmen. Konstant ist die Gruppierung der Hämocyanine von Cephalopoden, die der beiden Isoformen von *Nucula nucleus* und die der Vetigastropoden. Unstimmigkeiten treten hingegen bei der Zuordnung der Hämocyanine von *Rapana thomasi*, *Aplysia californica* und den beiden Chitonen auf. *Aplysia californica*-Hämocyanin wird meistens in einem Ast mit dem Vetigastropoden-Hämocyanin zusammengefasst, wobei nur etwa die Hälfte der Verzweigungen gut unterstützt ist. Indessen wird die Gruppierung der Hämocyanine von *Aplysia californica* und *Helix aspersa* bzw. *Helix pomatia* mit hohen statistischen Werten untermauert. Die basale Anordnung von AcH-h zum Bivalvia- und Vetigastropoda-Hämocyanin im MrBayes-Stammbaum wird mit der Neighbor-joining-Methode nicht bestätigt. Die Hämocyanin-Sequenzen der Chitonen liefern keine gut abgesicherte Zuordnung, sondern verschlechtern vielmehr die Auflösung der mit ihnen gruppierten funktionellen Domänen. Tendenziell zeigt sich eine engere Verwandtschaft des Chiton-Hämocyanins zum Cephalopoden- als zum Gastropoden-Hämocyanin. Bevor nun im Speziellen die Stellung der Hämocyanine von *Nucula nucleus* und *Nautilus pompilius* erläutert wird, soll kurz auf die statistische Absicherung eingegangen werden. Insgesamt liefert der Stammbaum, der mit MrBayes berechnet wurde, höhere Unterstützungswerte als der Neighbor-Joining-Stammbaum. Diese Beobachtung deckt sich mit einer kürzlich veröffentlichten Studie von Erixon et al. (2003), in der die Zuverlässigkeit der ‚Bayesian posterior probabilities‘ und des Bootstrapping verglichen wurden. Darin wurden unter Verwendung identischer Berechnungsmodelle signifikant höhere Wahrscheinlichkeiten

erzielt, als die Werte des Bootstrapping ergaben. Zugleich wurde aber auch auf Gefahren fehlerhafter Schlussfolgerungen bei der Bayesschen Analyse hingewiesen, während das Bootstrapping eine konservativere Absicherung lieferte.

5.1 Zur Phylogenie des Bivalvia-Hämocyanins

Das Hämocyanin von *Nucula nucleus* ist das erste sequenzierte Hämocyanin einer Muschel und somit im phylogenetischen Vergleich besonders interessant. Die beiden Isoformen dieses Hämocyanins gruppieren sich konstant und gut unterstützt in einem gemeinsamen Ast, was auf eine Duplikation der Isoform nach der Entstehung der Klasse Bivalvia schließen lässt. Die Anordnung von NnH in den Stammbäumen weist auf eine enge Verwandtschaft zwischen Bivalvia- und Gastropoda-Hämocyanin hin, was meist gut statistisch abgesichert ist. So ordnen sich die funktionellen Domänen von *Nucula nucleus* im MrBayes-Stammbaum stets zu den Gastropoden, wobei sie meistens eine Schwestergruppe zu diesen Formen. In drei Domänen-Ästen schieben sie sich sogar zwischen die Vetigastropoden und *Aplysia californica*. Im Neighbor-joining-Stammbaum liegen Bivalvia und Gastropoda in sechs Ästen als Schwestergruppe vor. In FU-b schiebt sich NnH zwischen die Vetigastropoden und *Aplysia californica*, wobei die Verzweigung schlecht unterstützt ist. In FU-a ordnet sich das Muschel-Hämocyanin basal zu den übrigen Hämocyaninen an. Nur im letzten Fall entspricht die Aufspaltung der Klassen etablierten morphologischen Vorstellungen. Danach gelten Gastropoden und Cephalopoden als Schwestergruppen, während Bivalvia und Scaphopoda zusammengestellt werden (Stasek, 1972). Doch zeigt sich bereits bei dem Aufbau einer Hämocyanin-Untereinheit von Bivalvia und Gastropoda eine größere Ähnlichkeit als im Vergleich zum Cephalopoden-Hämocyanin. So besitzen beide Klassen zwei aus acht Domänen bestehende Isoformen, die über eine Extension in der C-terminalen Domäne verfügen. Zudem liegen die Hämocyanine beider Klassen als Didekamere vor. Diese Beobachtungen stützen die enge Beziehung zwischen Gastropoden- und Bivalvier-Hämocyanin.

5.2 Zur Phylogenie des Cephalopoden-Hämocyanins

Die molekularen Stammbäume unterstützen deutlich eine Monophylie der Cephalopoden einerseits und der Coleoidea andererseits. Diese Klasse spaltet sich meistens in beiden phylogenetischen Bäumen als erstes von den übrigen Hämocyaninen ab. Innerhalb der Cephalopoden ist die basale Position von *Nautilus pompilius* zweifellos bestätigt. Einzig die

Zuordnung von *Sepia* ist bei zwei Domänen nicht den Erwartungen entsprechend. Zum einen gruppiert sich im MrBayes-Stammbaum SoH2-*b* mit OdH-*b*, was allerdings schlecht unterstützt ist und nicht durch den Neighbor-joining-Stammbaum bestätigt wird. Zum anderen ordnen sich die duplizierten Domänen von SoH-*d* nicht in einem Ast zusammen an; während sich SoH-*d1* mit OdH-*d* gruppiert, steht SoH-*d2* basal zu diesen. Diese Anordnung findet sich in beiden Stammbäumen wieder und spricht für SoH-*d1* als ‚ursprüngliche‘ und SoH-*d2* als duplizierte FU-*d*. Die konstante Abzweigung des Cephalopoden-Hämocyanins von den übrigen Hämocyaninen passt zu den strukturellen Besonderheiten des Hämocyanins dieser Klasse.

Der klaren Trennung von Nautiloidea (*Nautilus*) und Coleoidea (*Octopus* und *Sepia*) im molekularen Stammbaum steht der gleichartige Aufbau des *Nautilus pompilius*-Hämocyanins und des *Octopus dofleini*-Hämocyanins gegenüber, gekennzeichnet durch sieben FUs. Innerhalb der Coleoidea ist das synapomorphe Merkmal der duplizierten FU-*d* bei den Decabrachia (Sepioidea und Teuthoidea) Grund für die strukturell unterschiedlichen Hämocyanine (Chignell, 1997; Lamy, 1998).

Die Sequenzen der zweiten *Nautilus*-Art, nämlich *Nautilus macromphalus*, wurden aufgrund ihrer sehr hohen Identität von über 98 % zu den korrespondierenden funktionellen Domänen von *Nautilus pompilius*-Hämocyanin nicht in die Stammbauberechnung einbezogen, da eine Gruppierung der beiden Arten ohne Zweifel ist. Vermutlich haben sich die beiden Arten erst sehr spät getrennt. Deren Verwandtschaft wird in Kapitel D 6 diskutiert.

5.3 Molekulare Uhr

In den beiden Stammbäumen liegt eine stabile Trennung der Klassen Gastropoda und Cephalopoda innerhalb jeder gruppierten funktionellen Domäne vor (siehe **Abb. 55** und **Abb. 56**). Die Aufspaltung der Klassen fand aufgrund fossiler Belege vor 520 Millionen Jahren im späten Kambrium statt (Benton, 1993) und eignet sich zur Kalibrierung einer molekularen Uhr (Lieb et al., 2000; Altenhein et al., 2002).

Nach dieser molekularen Uhr (**Abb. 57**) beginnt die Evolution des Mollusken-Hämocyanins vor 732 Millionen Jahren mit der Diversifikation der acht funktionellen Domänen. Nach der Trennung Gastropoden-Cephalopoden erfolgte die Trennung der Gastropoda von den Protobranchia vor 494 Millionen Jahren, wobei die Standardabweichung sehr hoch ist. Tatsächlich reichen geologische Fossilien der Subklasse Protobranchia bis ins Kambrium zurück, die Nuculidae werden dem Ordoviciem (485 Mya) zugeordnet (Keen, 1969; Cope,

1997; Cope, 2000). Die Entstehung der beiden Isoformen von NnH wurde auf 396 Millionen Jahre zurückgerechnet, allerdings ebenfalls mit einer hohen Standardabweichung.

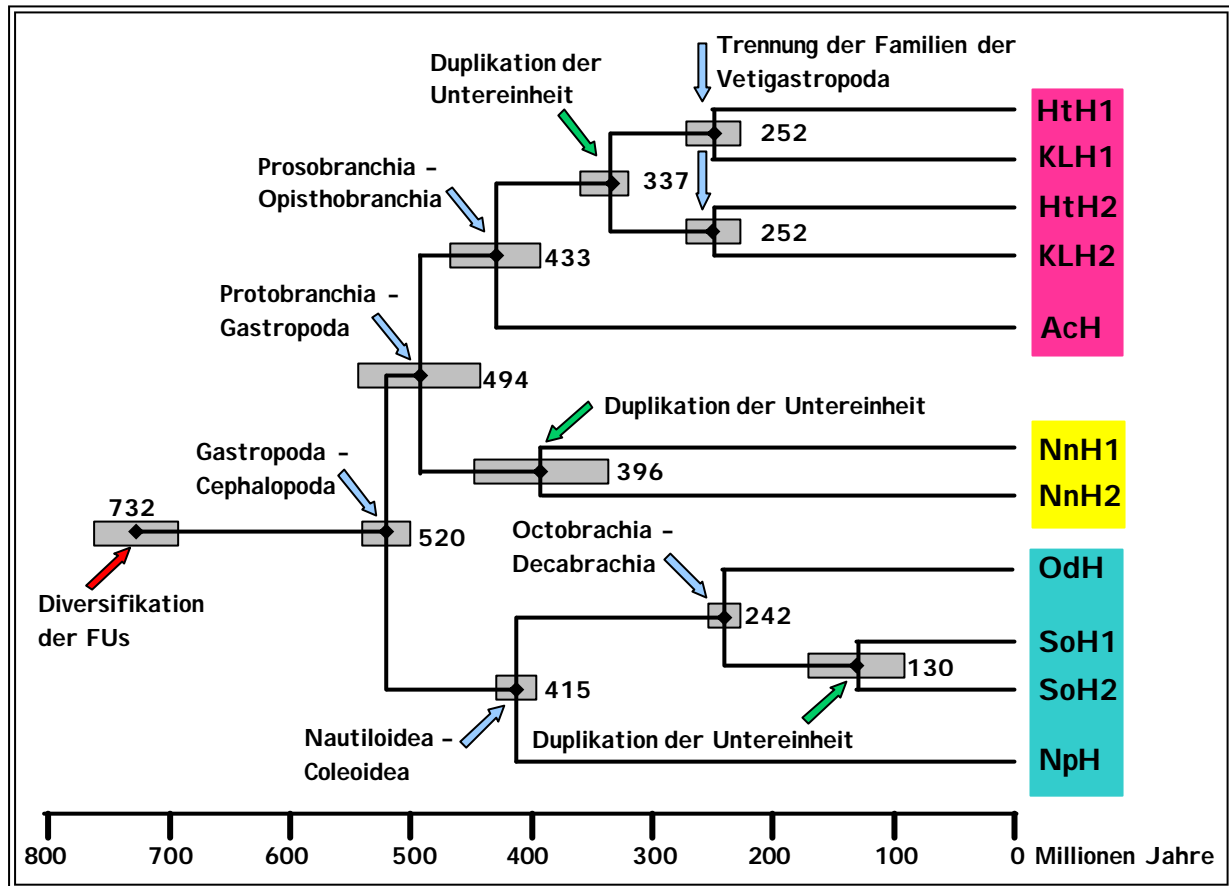


Abb. 57: Molekulare Uhr der Evolution der Mollusken-Hämocyanine.

Die Uhr basiert auf einem multiplen Sequenzalignment der einzelnen Domänen, anhand dessen die Distanzen berechnet wurden. Zur Kalibrierung wurde der Trennungzeitpunkt von Gastropoden und Cephalopoden verwendet, der sich vor 520 Millionen Jahren ereignete, was durch Fossilienfunde belegt ist (Benton, 1993). Die grauen Balken an den Verzweigungspunkten geben die Standardabweichung wieder. Die Klassen sind verschieden farbig unterlegt.

Innerhalb der Cephalopoden wurde anhand der Hämocyanin-Daten die Trennung zwischen Nautiloidea und Coleoidea auf 415 Millionen Jahre zurückdatiert. Bis zu diesem Zeitpunkt musste sich der Verlust der C-terminalen Domäne des Hämocyanins ereignet haben. Die Trennung der Dibranchiata in Octobranchia und Decabranchia reicht 242 Millionen Jahre zurück. Innerhalb der folgenden 100 Millionen Jahre fand die interne Verdopplung der FU-*d* des *Sepia*-Hämocyanins statt, da sich diese vor der Duplikation in zwei Isoformen vor 130 Millionen Jahren manifestiert hatte. Den Fossilien zufolge begann die Trennung in Nautiloidea und Coleoidea vor etwa 470 Millionen Jahren, im Zeitraum des Kambrium-Ordovicium-Übergangs. Diese Separation fand seinen endgültigen Abschluss im frühen Devon, vor ungefähr 400 Millionen Jahren. Die heute noch lebenden Coleoidea hatten

vermutlich ihren Ursprung in den bereits ausgestorbenen Belemniten, die im Oberkarbon das erste Mal auftraten und gegen Ende der Kreidezeit ausstarben. Während die ältesten Kalmarfossilien etwa 200 Millionen Jahre zurückreichen, traten die ersten sepienartigen Organismen erst im Tertiär auf. Schwierig ist die Datierung der Kraken, da sie sich aufgrund ihres weichen Körpers und der fehlenden Schale schlecht als Fossilien eignen. Untersuchungen zur Vollständigkeit von Fossilbelegen ergaben für die Cephalopoden - insbesondere die Coleoidea - eine hohe Diskrepanz zwischen Fossilfunden und lebender Fauna (Foote & Sepkoski, 1999).

Die molekulare Uhr datiert den Trennungszeitpunkt zwischen Prosobranchia und Opisthobranchia auf 433 Millionen Jahre zurück. Innerhalb der Vetigastropoden erfolgte in den darauf folgenden 100 Millionen Jahren die Duplikation des Hämocyanin-Gens, noch bevor die Familien entstanden. Die Spaltung in Pleurotomarioidea (Haliotidae) und Fissurelloidea (Fissurellidae) ereignete sich vor 252 Millionen Jahren. Die ersten Fossildaten von Vertretern der Aplysiidae stammen aus dem Miozän, vor etwa 20 Millionen Jahren (Benton, 1993). Die Trennung zwischen Orthogastropoda und Heterobranchia, die sich später in Pulmonata und Opisthobranchia aufspalteten, fand allerdings schon viel früher statt. Der älteste Vertreter der Heterobranchia reicht bis ins frühe Devon zurück und gehört der Familie Kuskokwimiidae an (Frýda, 2001; Frýda and Blodgett, 2001). Die frühesten Fossilien der Vetigastropoden sind 240 Millionen Jahre alt (Benton, 1993).

Die Gegenüberstellung von paläontologischen und molekularen Daten zeigt, dass die Zeitpunkte der Trennungseignisse im Rahmen der Standardabweichung gut übereinstimmen. Dafür lassen sich folgende Gründe anführen: Der Eichpunkt der molekularen Uhr ist gut ausgewählt, da alle errechneten Werte von diesem abhängen und Fehler in der Kalibrierung zu falschen Rückschlüssen führen würden (Lee, 1999). Zudem scheint das Hämocyanin für diese Berechnung geeignet zu sein. Es besitzt zum einen eine mittlere Substitutionsrate von etwa 5×10^{-9} , die sich anhand der Distanz und der Divergenzzeit errechnen lässt. Dazu wird die aus der molekularen Uhr abgelesene Divergenzzeit durch die Distanz zwischen zwei Monophyla dividiert und der erhaltene Wert anschließend durch 2 geteilt. Zum anderen weist es bei den verschiedenen Mollusken-Klassen eine konstante Substitutionsrate auf, da ansonsten starke Abweichungen zu den Fossildaten zu erwarten und die Astlängen der Stammbäume (**Abb. 55**, **Abb. 56**) sehr unterschiedlich wären.

Als letzter Gesichtspunkt der molekularen Uhr soll nochmals die Diversifikation der FUs vor etwa 732 Millionen Jahren aufgegriffen werden. Wie bereits von Lieb et al. (2000) diskutiert, wird dieses frühe Ereignis als ‚Geburtsstunde‘ eines extrazellulären Sauerstofftransporters angesehen. Allerdings wurde der erste definitive Fossilfund eines bilateralen Tieres auf

555 Millionen Jahre zurückdatiert (Fedonkin and Waggoner, 1997). Bei diesem Fossil handelt es sich um *Kimberella*, ein bilateralsymmetrischer Mollusken-ähnlicher Organismus, der bereits sehr komplex wirkt. Dafür sprechen als Radula-Spuren eingestufte Strukturen aus dieser Zeit, woraus auf eine aktive Fortbewegung geschlossen wird (Martin et al., 2000). Zwar datierten die meisten der bereits kalkulierten molekularen Uhren den Ursprung der Metazoen auf mehr als 800 Millionen Jahren zurück (Gu et al., 1998; Wang et al., 1999), doch viele dieser Berechnungen wurden kritisiert oder sogar widerlegt (Lee et al., 1999; Peterson et al., 2004). Zur Erklärung der frühen Datierung der Hämocyanin-Untereinheit bleiben zwei Möglichkeiten. Einerseits könnten Lücken in den Fossildaten für die Diskrepanz zwischen der molekularen Uhr und den verfügbaren Fossilbelegen verantwortlich sein. Diese liefern erste Beweise für das Auftreten eines Taxons und können aber aufgrund neuer Funde Veränderungen unterliegen. Andererseits wäre eine Änderung in der Substitutionsrate im Zeitraum zwischen der Entstehung der Untereinheit und der Auftrennung in die Mollusken-Klassen denkbar, wodurch dieser Abschnitt im späten Präkambrium zeitlich überschätzt werden würden.

6. Evolution von Hämocyanin und Mollusken - ein Vergleich

Die phylogenetische Beziehung zwischen den einzelnen Mollusken-Klassen wirft trotz zahlreicher morphologischer und molekularer Untersuchungen immer noch viele Fragen auf. Aus morphologischer Sicht handelt es sich bei den Schalen tragenden Mollusken, den **Conchifera**, um ein Monophylum (Götting, 1980a, 1980b). Dazu gehören die Klassen Gastropoda, Bivalvia, Cephalopoda, Scaphopoda und Monoplacophora (Götting, 1980a; von Salvini-Plawen, 1990a), die wiederum von einigen Autoren in **Diasoma** (Bivalvia, Scaphopoda und die fossilen 'Rostroconchia') und **Cyrtosoma** (Monoplacophora, Gastropoda und Cephalopoda) unterteilt werden (Runnegar & Pojeta, 1974; Pojeta 1980). Eine weitere Variante dieser Einteilung ist die Untergliederung der Cyrtosoma in **Visceroconcha** (Gastropoda und Cephalopoda) und die Monoplacophora als separate Gruppe (Steiner, 1992; von Salvini-Plawen & Steiner, 1996). Auch im Hinblick auf die Diasoma treten unterschiedliche Meinungen auf. Einige Autoren schlugen Scaphopoda und Bivalvia als monophyletische Gruppe vor (Lauterbach, 1984; von Salvini-Plawen & Steiner, 1996), für die der Name **Ancrypoda** eingeführt wurde (Hennig, 1979). Neuere morphologische Untersuchungen ordnen die Scaphopoden eher der Gastropoden-Cephalopoden-Gruppe zu (Waller, 1998; Wanninger & Haszprunar, 2002), und auch molekulare Daten basierend auf Sequenzierungen ribosomaler RNA und der Cytochrom Oxidase I unterstützen die

Schwestergruppen-Beziehung zwischen Scaphopoda und Cephalopoda (Giribet & Wheeler, 2002; Steiner & Dreyer, 2003; Passamanek et al., 2004). Bezüglich der Zuordnung der drei übrigen Mollusken-Klassen Polyplacophora, Solenogastres und Caudofoveata wurden ebenfalls verschiedene Möglichkeiten diskutiert. Einerseits wurden die drei Klassen als das zweite Subphylum **Aculifera** vorgeschlagen (Götting, 1980a; von Salvini-Plawen, 1990a). Andererseits wurden Solenogastres und Caudofoveata als **Aplacophora** zusammengefasst, die entweder monophyletisch (Götting, 1980a; Scheltema, 1996; Ivanov, 1996) oder paraphyletisch (von Salvini-Plawen, 1990a, 1990b) entstanden seien. Die Polyplacophoren stellen zu diesen die Schwestergruppe dar (Scheltema, 1993; 1996; Ivanov, 1996). Die Stammbäume der verschiedenen Hypothesen sind in **Abb. 58** zusammengefasst (nach Winnepenninckx et al., 1996).

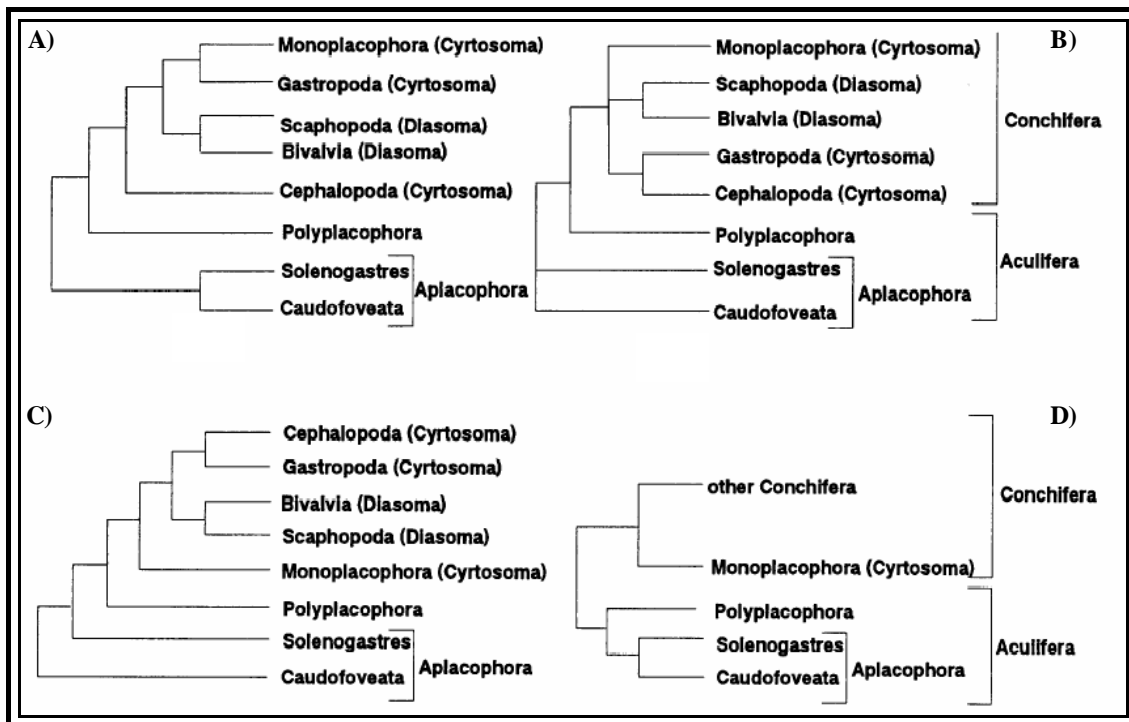


Abb. 58: Vergleich der Hypothesen der Mollusken-Phylogenie.

Die Abbildung stammt aus Winnepenninckx et al. (1996). Die Stammbäume A - D basieren auf morphologischen und larvalen Merkmalen. Für die Conchiferen ist die Zuordnung zu Diasoma oder Cyrtosoma in Klammern angegeben. Diese Trennung basiert auf paläontologische Daten (z.B. Runnegar & Pojeta, 1974, 1985; Pojeta, 1980; Steiner, 1992).

A) Stammbaum nach Götting (1980a, 1980b); B) Stammbaum nach von Salvini-Plawen (1990a, 1990b); C) Stammbaum nach Brusca & Brusca (1990); D) Stammbaum nach Scheltema (1993, 1996)

Schwieriger sieht die Zuordnung anhand von Stammbäumen aus, die auf Sequenzanalysen von z.B. 18S rRNA, 28S rRNA und Cytochrom-Oxidase (COI) basieren. Abgesehen von wenigen Arbeiten (Winnepenninckx et al., 1994; 1996; Lydeard et al., 2000) bezogen sich die

meisten Sequenzanalysen nicht auf das Gesamt-Phylum Mollusca, sondern auf einzelne Klassen bzw. Ordnungen (Schilthuizen et al., 1995; Bargues et al., 1997; Harasewych et al., 1997; Winnepenninckx et al., 1998; Wilding et al., 1999). Auf Ebene des Phylums wird die Verwandtschaft zwischen den einzelnen Mollusken-Klassen nur schlecht aufgelöst (Winnepenninckx et al., 1996), was zum Teil aus der polyphyletischen Auftrennung der Bivalvia und der Gastropoda resultiert.

Auf Ebene der Klassen liegen sowohl morphologische als auch molekulare Untersuchungen an Bivalvia und Cephalopoda vor, die im Folgenden kurz zusammengefasst und mit unseren Hämocyanin-Daten verglichen werden.

Molekulare Daten der Bivalvia zeigen einige Unstimmigkeiten sowohl in der Stellung der Klasse als auch innerhalb der Subklassen. So kamen Winnepenninckx et al. (1994) beim Vergleich von 18S rRNA-Sequenzen zu dem Ergebnis, dass die Bivalvia und Gastropoda jeweils monophyletisch sind und eine Schwestergruppe bilden. Kenchington et al. (1994) führte die gleiche Analyse unter Verwendung einer größeren Anzahl an Bivalvia-Taxa durch. Hierbei erscheinen die Muscheln als polyphyletische Gruppe. Grund für die schlechte Unterstützung der Muschel-Monophylie in molekularen Studien ist vor allem die Anordnung der Subklasse Protobranchia, da diese sich zum Teil zu den Außengruppen stellt (Adamkewicz et al., 1997; Campbell et al., 1998). Untersuchungen mit 18S rRNA-Sequenzen lösten zudem die Monophylie dieser Subklasse nicht auf (Adamkewicz et al., 1997). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine umfassende Studie von Giribet & Wheeler (2002), die sowohl auf molekularen als auch auf morphologischen Daten beruht. Dabei erwies sich vor allem die Monophylie der Protobranchia als fragwürdig; die Daten sprechen vielmehr für eine Paraphylie. Morphologisch gliedern sich die Protobranchia in die beiden Ordnungen Nuculoidea - mit den Superfamilien Nuculoidea und Nucularoidea - und Solemyoidea, wobei die monophyletische Herkunft bei den Nuculoidea unsicher ist (Morton, 1996; Waller, 1998). Die Mitglieder der Ordnung Nuculoidea werden als die ursprünglichsten Bivalvia innerhalb der Protobranchia, aber auch ancestrally zu den Lamellibranchiata angesehen. Zudem geht man davon aus, dass sie ein Schwestertaxon der übrigen Bivalvier darstellen. Diese Aufteilung ging sogar so weit, dass Waller et al. (1997) die Muscheln nur in zwei Subklassen untergliederte, nämlich in Protobranchia und Autobranchia (Autolamellibranchiata). Man könnte vermuten, dass Protobranchia und Lamellibranchiata eine unterschiedliche Herkunft haben und die Bivalvia somit diphyletisch sind. Dafür sprechen auch mehrere markante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. Unter anderem weisen die Protobranchia eine Pericalymma-Larve auf, gegenüber der lamellibranchiaten Veliger-Larve (Gustafson & Reid, 1986; 1988). Zudem stimmt die Struktur des Magens der Protobranchia eher mit der der

Gastropoden überein (Purchon, 1956). Und letztlich tritt das Hämocyanin nur bei protobranchiaten Muscheln auf. Würde sich die Annahme der Biphylyie bestätigen, hätte dies Auswirkungen auf die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Klassen. Hinsichtlich der Hämocyanin-Evolution könnte das erklären, warum die Gastropoden-Hämocyanine eine unerwartet enge Verwandtschaft mit dem Hämocyanin von *Nucula nucleus* aufweisen. Leider besitzen die lamellibranchiaten Muscheln kein Hämocyanin, und so kann ihre Phylogenie mit diesem Merkmal nicht weiter aufgeklärt werden.

Molekulare Untersuchungen an Cephalopoden lieferten klarere Ergebnisse als bei den Bivalviern. Die Monophylie der Subklassen Nautiloidea und Coleoidea ist relativ gut belegt. Untersuchungen mit 18S rRNA an drei *Nautilus*-Arten (*N. pompilius*, *N. macromphalus* und *N. scrobiculatus*) zeigten zum einen, dass dieses Molekül hier im Vergleich zu anderen Cephalopoden eine eigentümliche Insertion aufweist (Bonnaud et al., 2004). Zum anderen weicht die Hämocyanin-Sequenz von *N. scrobiculatus* deutlich von denen von *N. pompilius* und *N. macromphalus* ab, was für eine separate Art spricht. Ähnliche Ergebnisse wurden auf morphologischer Ebene und mit 16S rRNA erzielt (Wray et al., 1995). Dagegen zeigten Untersuchungen an mitochondrialen Genen (Wray et al., 1995), 18S rRNA (Bonnaud et al., 2004) und am Hämocyanin kaum Differenzen in der Nukleotidsequenz zwischen *Nautilus pompilius* und *Nautilus macromphalus*. Morphologisch sind die beiden Arten anhand ihrer charakteristischen Schalen leicht zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei den beiden Arten um geographische Varianten handelt (Wray et al., 1995; Bonnaud et al., 2004). Um die Aufspaltung innerhalb der Familien zu untersuchen, sind Analysen auf genomischer Ebene notwendig. Dabei können Intronsequenzen Informationen liefern, da sie keinem Selektionsdruck unterliegen und sich somit Mutationen angehäuft haben sollten. Dass sich hiermit auf Familienebene Phylogenie betreiben lässt, wurde kürzlich in unserer Arbeitsgruppe am Hämocyanin von Mitgliedern der Haliotidae demonstriert (Lieb et al., unveröffentlicht). Innerhalb der Coleoidea stimmt die Aufspaltung in Octobranchia und Decabrachia mit morphologischen Daten überein. Auch die monophyletische Herkunft beider findet hohe Unterstützung (Bonnaud et al., 1997). Schwierigkeiten bei der Zuordnung tritt vor allem bei den Vampyromorpha auf, was ebenso ein Streitpunkt unter Morphologen ist (Jeletzky, 1966; von Boletzky, 1992). Hierbei ist unklar, ob diese Ordnung eine engere Verwandtschaft mit den Octopoda zeigt oder eine Schwestergruppe zu den Decapoden darstellt. Bisher wird zur engeren Verwandtschaft zwischen den Ordnungen Octopoda und Vampyromorpha tendiert, die sich auf morphologische Untersuchungen (Young & Vecchione, 1996) und der Teilsequenzierung der Cytochrom-Oxidase III Gene (Bonnaud et al., 1997) stützt. Hämocyanin-Daten untermauern

die Zuordnung zu den Octobranchia, da eine aus sieben FUs bestehende Hämocyanin-Untereinheit beschrieben wurde (Mouche et al., 1999). Um das Bild des Cephalopoden-Hämocyanins zu vervollständigen, wären Sequenzdaten von Vampyromorpha und Theutoidea notwendig. Innerhalb der Octobranchia und Decabranchia liegt meist eine hohe statistische Absicherung der einzelnen Familien vor, doch die interfamiliäre Zuordnung ist schlecht aufgelöst, was ein Indiz für eine schnelle Radiation sein könnte (Bonnaud et al., 1997; Carlini et al., 2001). Auch Arbeiten mit mitochondrialer DNA weisen in diese Richtung (Bonnaud et al., 1997). Bei den Cephalopoda zeichnet sich Hämocyanin somit als hervorragender molekularer Marker ab, da es neben der Sequenzinformation auch aufgrund der unterschiedlichen Quartärstrukturen Hinweise zur Phylogenie liefert.

Um einen direkten Vergleich von verschiedenen molekularen Stammbäumen zu erhalten, wurden von den jeweils gleichen Gattungen Sequenzdaten von 18S rRNA, 28S rRNA, COI und Hämocyanin ausgewählt (die Accession-Nummern befinden sich im Anhang). Die Stammbaumanalyse wurde mit dem Programm ‚Phylip‘ nach der Neighbor-joining-Methode durchgeführt, basierend auf einer PAM-Matrix. Die Aminosäuresequenzen der COI-Daten wurden vor der Analyse editiert, während die Sequenzen der ribosomalen RNA ohne Korrektur zur Berechnung verwendet wurden. Zur Darstellung wurden radiale Stammbäume gewählt, da eine geeignete Außengruppe fehlt (**Abb. 59**).

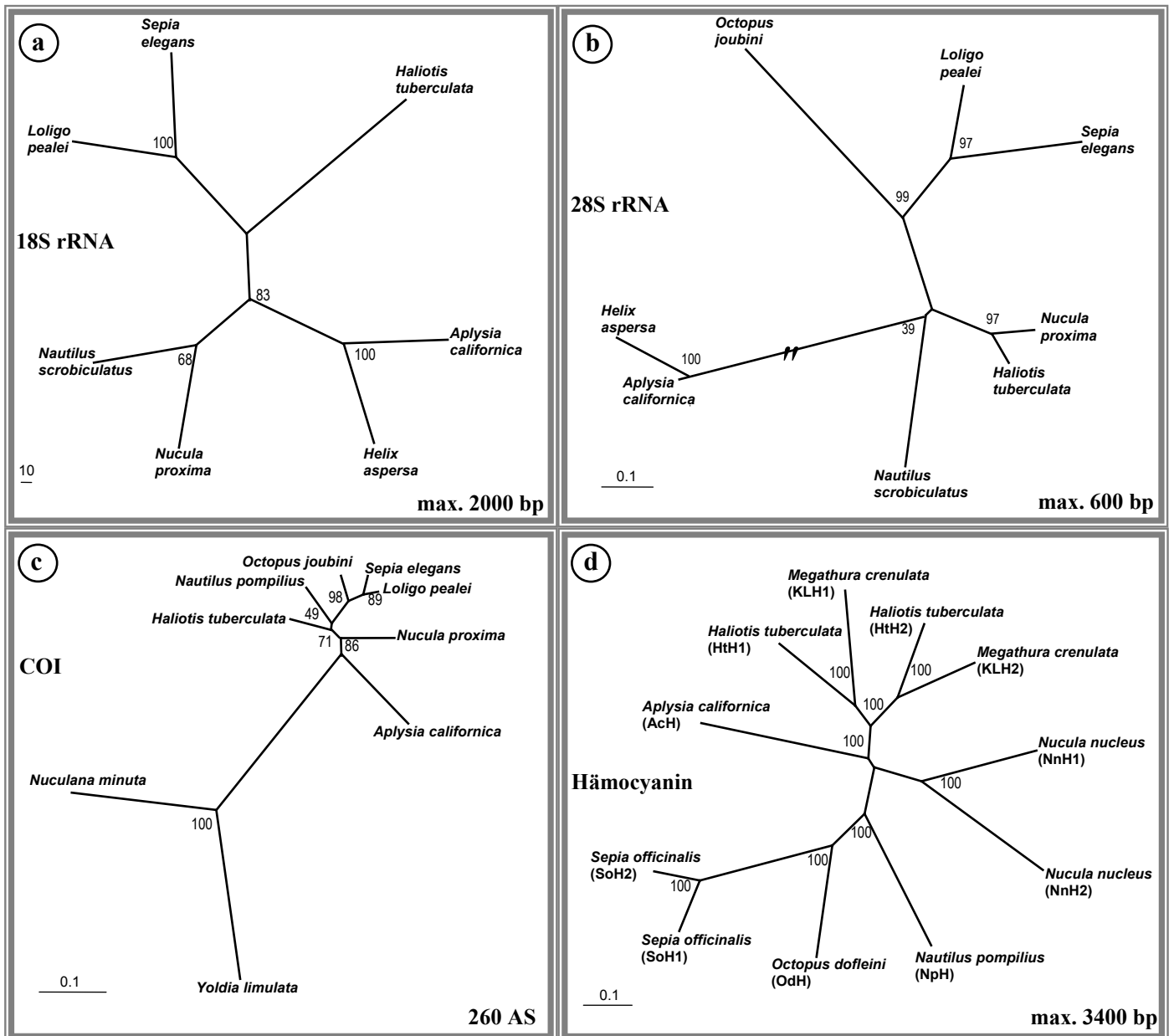


Abb. 59: Vergleich von molekularen Stammbäumen basierend auf Sequenzdaten von (a) 18S rRNA (bp), (b) 28S rRNA (bp), (c) Cytochrom Oxidase I (AS) und (d) Hämocyanin (AS).

Alle Stammbäume wurden mit dem Programm ‚Phylip‘ unter Anwendung der Neighbor-joining-Methode berechnet, der die PAM-Matrix zugrunde gelegt wurde. Die Aminosäuresequenzen wurden zuvor editiert und Überhänge abgeschnitten. Die rRNA-Sequenzen wurden uneditiert verwendet. Die Stammbäume sind radial dargestellt, da eine geeignete Außengruppe fehlt. In b) ist der gemeinsame Ast von *Helix aspersa* und *Aplysia californica* verkürzt dargestellt (gekennzeichnet durch zwei parallele Striche). Die Accession-Nummern der verwendeten Sequenzdaten befinden sich im Anhang.

Die Stammbäume der 18S rRNA, 28S rRNA und COI weisen zum Teil sehr niedrige Unterstützungswerte auf, so dass die entsprechenden Verzweigungspunkte keine klare Aussage über die Verwandtschaftsbeziehungen liefern. In beiden Stammbäumen der ribosomalen RNA findet man keine Trennung in die einzelnen Klassen. Die einzige konstante Zuordnung erfolgt innerhalb der Coleoidea und der Heterobranchia. Dagegen werden bei den 18S rRNA-Sequenzen *Nucula proxima* und *Nautilus scrobiculatus* gruppiert, während nach den 28S rRNA-Daten *Nucula proxima* und *Haliotis tuberculata* zueinander gestellt werden. Möglicherweise trägt die fehlende Editierung bei den RNA-Stammbäumen zu der schlechten Auflösung bei, da ein fehlerhaftes Alignment als Grundlage für die Stammbaumberechnung dienen könnte. Nach der COI-Analyse handelt es sich sowohl bei den Gastropoden als auch bei den Bivalvia um keine monophyletische Gruppe. Die beiden protobranchiaten Muscheln *Nuculana minuta* und *Yoldia limulata* ordnen sich in einem sehr langen Ast zueinander an, da ihre Sequenzen sehr stark von den anderen abweichen. Besser aufgelöst werden dagegen die Cephalopoden, wobei die Verzweigungen innerhalb der Coleoidea gut, die basale Stellung von *Nautilus pompilius* schlecht unterstützt ist. Da die COI-Sequenz nur etwa 260 Aminosäuren umfasst, fallen einzelne Aminosäureaustausche stärker ins Gewicht. Die Stammbäume der 18S rRNA, 28S rRNA und COI sowie des Hämocyanins lösen die Verwandtschaftsbeziehung der Klassen zueinander nicht auf. Grund für dieses Ergebnis könnte die schnelle Radiation der Mollusken-Klassen sein, wodurch die Anzahl der Sequenzänderungen nicht ausreicht, um eine zuverlässige Rekonstruktion zu erstellen. Philippe et al. (1994) wiesen bereits auf die Schwierigkeit hin, Tiergruppen anhand molekularer Daten zu differenzieren, die sich vor sehr langer Zeit innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums entwickelt haben. Die fehlende Außengruppe und die Beschränkung auf wenige Klassen stellen ebenfalls Probleme bei der Auflösung des Phylums dar. Im Unterschied zu den anderen molekularen Stammbäumen zeigt die phylogenetische Analyse mit der kompletten Hämocyanin-Sequenz (etwa 3000 Aminosäuren) allerdings eine optimal unterstützte Trennung in die Klassen Bivalvia, Cephalopoda und Gastropoda. Auch innerhalb der Klassen werden die Verwandtschaftsbeziehungen klar aufgelöst, so dass sich Hämocyanin auf dieser Ebene weit besser als die anderen drei Systeme als phylogenetischer Marker eignet.

7. *Ausblick*

Diese Arbeit lieferte neben den Hämocyanin-Sequenzen von *Nucula nucleus* und *Nautilus pompilius* auch Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Beim Muschel-Hämocyanin könnten weitere Analysen an der Genstruktur die Position der internen Introns in beiden Isoformen aufklären. Außerdem ist bisher nichts über den Expressionsort des Hämocyanins in Muscheln bekannt, was nun durch in-situ-Hybridisierungen untersucht werden könnte. Diese Methode könnte auch zur Lokalisierung der Gene der beiden Isoformen auf den Chromosomen verwendet werden, da auch hierüber noch nichts bekannt ist. Aufschlussreich könnten auch einhergehende funktionelle Untersuchungen sein. Bisherige Studien an Muschel-Hämocyanin zeigten nämlich, dass z.B. der Bohr-Effekt eher der Situation bei Polyplacophoren und Cephalopoden als der bei Gastropoden entspricht (Mangum et al., 1987). Hilfreich wäre dabei eine Methode zu finden, um die beiden Isoformen voneinander zu trennen. Dies würde auch Klarheit über quantitative Unterschiede der beiden Isoformen in der Hämolymphe liefern. Eine zu klärende Frage ist außerdem, warum es zwei Isoformen gibt. Da bei anderen Protobranchia auch intrazelluläres Hämoglobin gefunden wurde, wäre interessant, das Vorhandensein dieses Gens bei *Nucula* zu überprüfen. Umgekehrt wäre ein Nachweis des Hämocyanins auf genomischer Ebene bei anderen Muschel-Ordnungen ein weiterer Ansatzpunkt.

Beim *Nautilus pompilius*-Hämocyanin wäre als erstes zu klären, ob die nicht der Untereinheit zugeordneten Sequenzen aus einer zweiten Isoform oder aus einem Pseudogen stammen. Falls eine zweite Isoform des *Nautilus*-Hämocyanins existiert, wäre deren Primärstruktur, Genstruktur und biochemische Eigenschaften zu klären. Um ein vollständiges Bild von der Evolution des Cephalopoden-Hämocyanins zu erhalten, wäre die Sequenzierung eines Hämocyanins der Theutoidea und Vampyromorpha aufschlussreich. Da als zweite Gattung innerhalb der Nautiloidea der *Allonautilus* als einzige Art existiert, wäre dessen Hämocyanin ebenso ein interessantes Objekt, wobei die Untersuchung aufgrund der zu erwartenden Ähnlichkeit möglicherweise auf der Genstruktur basieren müsste.

Um die Hämocyanin-Phylogenie besser auflösen zu können, sollte die Suche nach einer geeigneten Außengruppe nicht aus den Augen verloren werden. Dabei würde sich die zu den Monoplacophora gehörende *Neopilina* anbieten, da dieser Organismus als ein sehr ursprünglicher Vertreter der Mollusken gesehen wird. Allerdings müsste dafür zuerst das Vorhandensein von Hämocyanin nachgewiesen werden. Zudem wäre die Vervollständigung der Hämocyanin-Sequenz eines Polyplacophoren interessant, auch wenn die bisher sequenzierten funktionellen Domänen zu keiner besseren Auflösung geführt haben. Ein

aufschlussreicher Aspekt bei den Chitonen könnte aber der Zusammenhang zwischen Primär- und Quartärstruktur darstellen, da diese Hämocyaneine keine Didekamere bilden (Lambert et al., 1994b), obwohl sie acht Domänen mit einer Extension der C-terminalen Domäne besitzen (unveröffentlichte Daten aus unserem Arbeitskreis). Diese beiden Eigenschaften waren bisher der Hauptunterschied zwischen dem dekameren Hämocyanin der Cephalopoda und den Didekameren von Gastropoda und Bivalvia.

Diese Ansätze können möglicherweise Antworten auf die Fragen liefern, warum die Quartärstrukturen der Mollusken-Hämocyaneine so verschieden sind, welche biologische Bedeutung damit verbunden ist und wie sich ihre Evolution ereignet hat.

E Zusammenfassung

Als erste vollständige cDNA-Sequenz eines Muschel-Hämocyanins wurde das *Nucula nucleus*-Hämocyanin (NnH) sequenziert. Es besteht aus den beiden Isoformen NnH1 und NnH2, die eine Identität von etwa 61 % aufweisen. Beide sind aus acht funktionellen Domänen *a-h* aufgebaut, von denen die C-terminale Domäne *h* jeweils eine Extension von etwa 100 Aminosäuren besitzt. Auf Sequenzebene weist das Muschel-Hämocyanin eine eigentümliche Deletion im Bereich der ersten Kupferbindungsstelle und eine auffällig niedrige Anzahl an potentiellen N-Glykosylierungsstellen auf. Genomische Teilsequenzen bestätigen die Konservierung der Linkerintrons in Phase und Position, was bei den internen Introns nicht zu erkennen ist. Letztere konnten in den für die Domänen NnH1-*d*, NnH1-*e* und NnH2-*c* codierenden Genabschnitten nachgewiesen werden. Einen neuen Aspekt lieferte das interne Intron in NnH2-*c*, da es nur in einer der beiden Isoformen vorkommt.

Das zweite sequenzierte Hämocyanin stammt von dem „lebenden Fossil“ *Nautilus pompilius* (NpH). Es wurde sowohl auf cDNA- als auch auf genomischer Ebene vollständig sequenziert und besteht aus sieben funktionellen Domänen, wobei die C-terminale Domäne *h* fehlt. Zu seinen Eigentümlichkeiten gehört neben 13 potentiellen N-Glykosylierungsstellen, von denen sich zwei innerhalb von Linkerregionen befinden, eine Deletion im Bereich der ersten Kupferbindungsstelle von NpH-*g*. Neben den konservierten Linkerintrons liegt ein Intron innerhalb des Signalpeptids sowie in den Genabschnitten für NpH-*a* und NpH-*g*. Dagegen ist weder zwischen dem Signalpeptid und NpH-*a* noch innerhalb der 3'UTR ein Intron vorhanden.

Anhand der neuen Sequenzdaten wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt, in der sich die funktionellen Domänen von NnH als Schwestergruppe zu den korrespondierenden Domänen der Gastropoden anordnen. Den Erwartungen entsprechend stellt sich NpH basal innerhalb der Klasse der Cephalopoden. Phylogenetische Analysen mit der vollständigen Hämocyanin-Sequenz lösen die Verwandtschaftsverhältnisse der Klassen zueinander nicht auf, was auf schnelle Radiation schließen lässt. Die Gruppierungen innerhalb der Klassen werden dagegen sehr gut unterstützt.

Mittels einer Distanzmatrix wurde eine molekulare Uhr berechnet, für deren Eichpunkt die Cephalopoden-Gastropoden-Aufspaltung vor 520 Millionen Jahren gewählt wurde. Die Entstehung der Acht-Domänen-Untereinheit fand danach vor 732 (\pm 33) Millionen Jahren statt. Die Trennung der Gastropoda und Protobranchia erfolgte vor 494 (\pm 50) Millionen Jahren, was mit Fossilfunden der Nuculidae aus dem Ordoviciem übereinstimmt. Vor

396 (\pm 55) Millionen Jahren gingen aus einer Genduplikation die beiden Isoformen des *Nucula nucleus*-Hämocyanins hervor. Innerhalb der Cephalopoden wurde die Trennung zwischen Nautiloidea und Coleoidea auf 415 (\pm 24) Millionen Jahre zurückdatiert. Nach Fossildaten liegt der Trennungszeitraum der beiden Gruppen 470 - 400 Millionen Jahre zurück, was gut zu den Hämocyanin-Daten passt.

F Anhang

1. Abkürzungen

| | |
|-------------------|--|
| AP | Alkalische Phosphatase |
| BCIP | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz |
| BSA | Rinderserumalbumin (bovine serum albumine) |
| cDNA | copy- oder complement-DNA |
| CIA | Chloroform-Isoamylalkohol |
| COI | Cytochrom-Oxidase I |
| CTAB | Cetyltrimethylammoniumchlorid |
| Da | Dalton |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| Dig | Digoxygenin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| dsDNA | Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (double strand DNA) |
| DU | Duplication unit |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FU | Functional unit |
| GTC | Guanidinthiocyanat |
| dH ₂ O | Bidestilliertes Wasser |
| Ig | Immunglobulin, Antikörper |
| IP | Isoelektrischer Punkt |
| IPTG | Isopropyl-β-D-Galactosid |
| kb | Kilobasen (1000 Nukleotide) |
| kDa | Kilodalton, 10 ³ Dalton |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäure Natriumsalz |
| mRNA | Messenger RNA |
| MYA | Million years ago |
| NBT | p-Nitrobluetetrazoliumchlorid |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | offenes Leseraster (open reading frame) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction) |
| pfu | Plauebildende Einheiten (plaque forming units) |
| RACE | Rapid amplification of cDNA ends |
| rRNA | Ribosomale Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| RT | Reverse Transkriptase |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| ssDNA | Einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure (single strand DNA) |
| TBS/TBST | Tris-Buffered-Saline / and Tween |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| U | Unit |
| UTR | Untranslatierter Bereich (untranslated region) |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumen pro Volumen (volume/volume) |
| w/v | Gewicht pro Volumen (weight/volume) |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galctosid |

2. Abkürzungen der Hämocyanine

| | |
|-----|--|
| AcH | <i>Aplysia californica</i> Hämocyanin |
| AfH | <i>Acanthochiton fascicularis</i> Hämocyanin |
| Hah | <i>Helix aspersa</i> Hämocyanin |
| HpH | <i>Helix pomatia</i> Hämocyanin |
| HtH | <i>Haliotis tuberculata</i> Hämocyanin |
| KLH | <i>Megathura crenulata</i> Hämocyanin |
| LcH | <i>Lepidochiton cinereus</i> Hämocyanin |
| NmH | <i>Nautilus pompilius</i> Hämocyanin |
| NnH | <i>Nucula nucleus</i> Hämocyanin |
| NpH | <i>Nautilus pompilius</i> Hämocyanin |
| OdH | <i>Octopus dofleini</i> Hämocyanin |
| RtH | <i>Rapana thomasi</i> Hämocyanin |
| SoH | <i>Sepia officinalis</i> Hämocyanin |

3. Abkürzungscode-Code 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 |

4. Der genetische Code für Eukaryoten

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

5. IUPAC-Code Nukleinsäuren

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

6. *EMBL-Accession-Nr.*

| Accession-Nr. | Organismus | Molekül |
|----------------------|--------------------------------|----------------------|
| AY039804 | <i>Aplysia californica</i> | 18S rRNA |
| AF20502 | <i>Lepidopleurus cajetanus</i> | 18S rRNA |
| AF20503 | <i>Acanthochitona crinita</i> | 18S rRNA |
| AF20504 | <i>Nautilus scrobiculatus</i> | 18S rRNA |
| AF20505 | <i>Loligo pealei</i> | 18S rRNA |
| AF20507 | <i>Sepia elegans</i> | 18S rRNA |
| AF20511 | <i>Haliotis tuberculata</i> | 18S rRNA |
| AF20526 | <i>Nucula proxima</i> | 18S rRNA |
| X91976 | <i>Helix aspersa</i> | 18S rRNA |
| AF120565 | <i>Lepidopleurus cajetanus</i> | 28S rRNA |
| AF120566 | <i>Acanthochitona crinita</i> | 28S rRNA |
| AF411688 | <i>Nautilus scrobiculatus</i> | 28S rRNA |
| AF120568 | <i>Loligo pealei</i> | 28S rRNA |
| AF120569 | <i>Sepia elegans</i> | 28S rRNA |
| AF120570 | <i>Haliotis tuberculata</i> | 28S rRNA |
| AF120583 | <i>Nucula proxima</i> | 28S rRNA |
| AY377698 | <i>Octopus joubini</i> | 28S rRNA |
| U75842 | <i>Aplysia californica</i> | 28S rRNA |
| AF327536 | <i>Helix aspersa</i> | 28S rRNA |
| AAR25486 | <i>Octopus joubini</i> | Cytochrome C Oxidase |
| AAQ74908 | <i>Sepia elegans</i> | Cytochrome C Oxidase |
| AAL55479 | <i>Loligo pealei</i> | Cytochrome C Oxidase |
| AAR25470 | <i>Chiton olivaceus</i> | Cytochrome C Oxidase |
| AAR25483 | <i>Haliotis tuberculata</i> | Cytochrome C Oxidase |
| AAL55478 | <i>Nautilus pompilius</i> | Cytochrome C Oxidase |
| AAF67250 | <i>Aplysia punctata</i> | Cytochrome C Oxidase |
| AAL55491 | <i>Nucula proxima</i> | Cytochrome C Oxidase |
| AAL55492 | <i>Yoldia limulata</i> | Cytochrome C Oxidase |
| AAL55493 | <i>Nuculana minuta</i> | Cytochrome C Oxidase |

7. Verwendete PCR-Primer

| Name | US/DS (upstream/ downstream) | Sequenz in 5´-3´ Orientierung |
|--------|------------------------------------|--------------------------------|
| NpH-s1 | us | ATGGCGACTCACTGGCACAGCTTGCTG |
| NpH-s2 | us | CTGCAGCTCCTTGTCTTCACTTATGCT |
| NpH-s1 | ds | GTGGCACCTGATGGTACTTACCT |
| NpH-s2 | ds | ATATTGGTGCCTGATTTAGTGTTG |
| NpH-a | us | CAATATCCGTAAAAATGTGG |
| NpH-a | ds | TGATAACTCTCCAATTGGTTTCCAGGC |
| NpH-b | us | CACCCATGCGCCAGATTGACAGAG |
| NpH-b | ds | CCACACATATCTCTTTGACGG |
| NpH-b2 | us | TTCATGATGtCAATGGCAG |
| NpH-b2 | ds | ACATCATCTTTGTTCCAgCA |
| NpH-c | us | TAAAAAGTATGAATATCAGCC |
| NpH-c | ds | CCAGAAGAAACATCAACAG |
| NpH-c2 | us | GATCTACATAACAAAGTGG |
| NpH-c2 | ds | GAAGAGTTTTTCGCCAACTGTG |
| NpH-d | us | GTACCTATGGAACTCAGAC |
| NpH-d | ds | CCACTTACCAGCATTGATG |
| NpH-d2 | us | CACATTTGACTCGCACATC |
| NpH-d2 | ds | GATTTTCATTTGTGCCTGCACCAG |
| NpH-e | us | GATCCAAAAATGCAACTCATTATC |
| NpH-e | ds | GGTGGTGTACGCTTTCAGAC |
| NpH-e2 | us | CATTCACATTCATGACATGG |
| NpH-e2 | ds | CTATTCTCCGCCAACAGCTGCAG |
| NpH-f | us | AACATCACGAAGTGCATCATCC |
| NpH-f | ds | CAGGCACAACATCAATGAC |
| NpH-f2 | us | GAAATCAATGCTGTAAATGG |
| NpH-f2 | ds | CATATcATGCACGAGCCCaCCTTA |
| NpH-g | us | ATACCAAACAAGCAGAAAGAG |
| NpH-g | ds | GGTCACTGAAACAGAACATAATCCATTCCA |
| NpH-g2 | ds | CTCACCTGGAAGAGGAGCCC |
| NpH-3´ | ds | TAGTTTGCCTGTACTACCACA |
| | | |
| NnH1-s | us | ATGAGGCTTCCATTAATAT |
| NnH1-a | us | GACACAGACAGTATCTGCC |
| NnH1-a | ds | GCACTTGTATCAGGTACCG |
| NnH1-b | us | CCTACATTACACCGCCTTTGATCC |
| NnH1-c | us | TGTTGTCCAGTTTGAAGCTG |
| NnH1-c | ds | CCATACAACAGAGCCAACTG |

| | | |
|---------|----|-----------------------------|
| NnH1-e | us | CACATCACGGAGGATCGGAC |
| NnH1-e | ds | CGATCTCAGAGCCATCCGTC |
| NnH1-f | us | TGCACACAACCAAGTAAGACG |
| NnH1-f | ds | CATCTGAATTACACAAGCCAAC |
| NnH1-g | us | TTTACCGTCAGATGCTCCTG |
| NnH1-g | ds | CATTGCGCTCTTTCAACTATG |
| NnH1-h | us | GTTTGAGAGAGGTTTGGTCGATAATGG |
| NnH1-3' | ds | CTGTTCTTATTTCGAGGTAGG |
| NnH2-s | us | ATGCGTCTGCCTTTCATAG |
| NnH2-a | us | CCATCACTCCAACGTGGACAG |
| NnH2-a | ds | CACCACACAGACAGAGCTAT |
| NnH2-b | ds | CAGCCCTTTGAATACGAATGAG |
| NnH2-c | us | GTGCAGAATACAAAGATCATG |
| NnH2-c | ds | CATTCATCAAGTAGCTAGA |
| NnH2-d | us | ACGAAGATGAGTTTGAAGAAG |
| NnH2-d | ds | ATCATCTTCGAGCCCG |
| NnH2-e | us | ATGTAGATCACAGCCACGATG |
| NnH2-e | ds | GTAATATTTGTTCTTGGTACT |
| NnH2-f | us | GTGACCACAATACCGACGCTT |
| NnH2-f | ds | CATCTATGACCCACCTCATA |
| NnH2-g | us | TGCCGGTGATCATGATCC |
| NnH2-g | ds | GCACCAGAGGTCGTCTTTC |
| NnH2-h | us | GACTATTCGGCATTGATCC |
| NnH2-3' | ds | ACAGCATGCTCATCAATAG |
| | | |
| PYWDW | us | GGYYTNCNTACTGGGAYTGGAC |
| PYWDW | ds | GTGTCCARTCCCAGTANGG |
| WAIWQ | us | TGGGCNARTTGGCARGC |
| WAIWQ | ds | GCYTGCCAYATNGCCCA |

8. DNA-Sequenzen

Nucula nucleus

Isoform 1

5' UTR

GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAGAGAGACGGACGCGACCCAACCGGTGACACCGATCACTCCTTGGAG

Signalpeptid

ATGAGGCTTCCATTAATATTTCTGGCCTTGGGCATTTCAGGTCTGTATTGTTTCATCT

NnH1-a

CTTCTGGTTCGGAAAGATGTCGACAGTCTTACCACAGCGGAAGTGCTTGGCCTTCAAGAGGCATTA AAAAGAAGTG
CAGGAAGACACTGGCCCTACCGCTACCAGGCCATTGCGGCGTACCACGGCTATCCAGGGGATCTTTGCGCACAT
GACGGCCACAAAATGGCATGCTGCATTTCATGGAATGCCAACCTTTCCACAGTGGCACAGACTGTTCCACACACAG
ATGGAACAAGCTCTTCGTGAGAAGGACTTGGCATTGGAGTTCATACACTGGGACTGGACACAGACAGTATCTGCC
CTGCCACGCTTGTAAAGAGATCCCATCTATATTAACCTCAGCAGGCGGAAAGCGCTGAAAACTATTGGCACAAG
GGTGTGATTAAAGATGCGGGAACACAGATAGAGCGATTGACGATCGTCTGTTTGAACAGCCTGAGACAGGGCAT
TACACAAACGCAATGGAAGGTTATTGCTGGCCCTGGAGCAAGAAGACTATTGCAAGTTTGAATCCAGTTTGAA
GTGGCACACAACGATATTCACTACCTGGTTGGCGGCAGATACGGGAAATCCATGTCAAGTCTCGAATACACCTCC
TATGACCCGATCTTCTTCCCTCCATCACTCCAATGTTGACAGGATATTGCCATTTGGCAAGCTTTGCAGAAAAAG
AGAGGATTACCCTGGGACCACTCCAATTGTGGACTAGAAATGTTCCGAACACCTCTTGAGCCCTTTGGAAGAGAC
TCAAATCCCTTTGAAGTGACAAAAGCCACTCCAAGGGAGCCGACGCTTCGATTATCAAAACTTGGGTTACCAG
TACCACGACTTAACCCTGAATGGGATGTCCGTTGATGATCTTTACACTCTCCTTAACGAAAGGAAGACCCACGAA
AGGGCCTTCGCTAGTTTCCGTTTGTACGGATTTGGTGGTTCCGCCAATGTCAGGGTGCAGGTTTGTAAACGGGAT
GACGATGAGCACAGTCCGGACAGATGCCATTTCCGCCGTGACGTCTCTGTTCTAGGTGGCCCTACCGAGATGCCG
TGGGCCTTTCATCAGCCTTACCTGTTTACATCACCGATACTTTCCATAAGCATGGCATCGATTTTACCAAAAAT
TTTTATATCAAAACCGAATTGTATGCGGTGAACGGCTCGGCTTTGCCATCCGATGCACTTGTATCAGGTACCGGT
GTGCACCAGCCTCCCGCAGGCTATCTAGACC

NnH1-b

CTAAACCGGCTCCTGTAGATAGAAGTGGTCTCGCTGTTAGAAAAATTTAGACCGCTTAACAGACGAGGAAGTTG
ATTCACTGAGGAAAGCAATGGCTCGTTTACAAAGCGACAAGTCCGTTGACGGATATGACGCAATTGCGGAGTATC
ATGGCCTTCCCGCTAGGTGTCCAAGACCTGATGCCGCGAAGAGATTGCTTGCTGTGTCCATGGAATGCCTACTT
TTCTCATTGGCACCGTTTATACATGGTACAGTTAGAAGATGCATTGGTCGATCGTGGCTCTACCATCGGCCTGC
CTTACTGGGACTGGACCAAGCCACTCATAGGTCTGCCGGACCTAATAAGTAATAAGATGTACAAAGATCCCCAAA
CAGGTGCAATACTGACAATCCTTTTACCATGGTAGTGTGGCGTTTGAAGGGCATGTAAGTATGATCGTGTATCCAG
ACTCCCGACTGTTTGGAGCCCTTCATATGGCGACCACACGGCCCTCTTTGATGGCATGCTTCTTGCTCTCGAAC
AAGAAGACTTTTGGCACTTTGAGGTTTCAAGTTTGGAGTTGACACATAACAACCTCCACGCGTGGGTTGGCGGATCCG
CCAAATATTGATGTCTCCTACATTACACCGCCTTTGATCCTGTTTCTACCTGCACCACTCAAACGTCGATA
GATTGTGGGCGATGTGGCAGGCGCTGCAGCAGTACCAGGAAAGCCCTACAAGGCACACTGCGCTACCACGTACA
CCTATTATCCTCTCAAACCTTTGCGTTCAAGTACCTCTTAATAACAACGAAAAGACACAAAAGCATGCCGTTTC
CTACGAACGTCTACGATTACGAAAGCGAACTAGGATATAGCTTTGATTCTTGGAAATTCGGTGGAAATGGGTATCC
AAGAGCTGGACCACTATATTCAAGAACGTAAGGCTACAGATAGAGTATTGTTGGATTTCTGCTGGAAGGCTTCC
AAAAATCAGCCAATGTGGATTTCTTTATTGAAAGATCTGGGCAGGACAAAATTTAAAGCAGGGACTATAGCTGTGT
TGGGTGGTTCCGGCAGAGATGAAGTGGCGCTTCGATAGGGTTTACAAACACGAAATCACGGAGTCACTGACAACTC
TCGGTCTAACCAAGACAGCGATTTACAGCATCTCAGTAACACTGACTGACGTAGATGGAACAGAATTAGATGCCA
CGTCTTTCATGACCAACCATTATATTTGAACCGAGCCATG

NnH1-c

CTGCGGAAGACAGACCAACTGATTTTAGAGTAGTCCGGAAGAATGCCGATCGCTTAACAGAGACTGAAACCGACA
GCCTTGATACATGCTTTAAAGAACTGCAAGAGGACACCGGTGCAGGCGGATTCGCCCAAATGGGCGCATTTACAG
GATTGCCAACTGGTGTGAGGTTGGTGTGAAAAGGTAGCTTGGTTGCGCGCATGGCATGGCAGTATTTCCACACT
GGCACAGACTACTTGTGTCCAGTTGAAGCTGGTCTTACAAAGTACGGGTACAAAAGTGGTGTTCCTTACTGGG
ACTCGTTCATCACTATGGATTCACTTCTACTTTGGCTAATGCGCAACATATACACACCTGAAAGATGGCTCAT
CGATTCCTAATCCTTTCTACTCATTGATGTTGTGCAAGGTGGAGTTTCCACACCACAAGTCGAGCCCCGCGAC
AGGAGCTGTTTGAAGATCCGGGCTTTGGCAAACATACAAAGGTGGCGAAACAGGTGATGCTGGCATTGAGCAAG
AGGACTTTTGTTCCTTCGAGACCCAGTTCGAAATTGCCACAACCTTCATACACGCGTACGTTGGCGGTAAGGACG

AGTACTCAATGGCATCCCTACGCTACACTGCTTTTGATCCAATCTTCTACCTCCACCATTCCAACACCGATAGAA
TATGGGCGATGTGGCAAGCTTTGCAGAAGTATCGTGGCAAGCCATACAACAGAGCCAACCTGCGCCCTGGATTCAA
TGAGGGCCCATCTTAAGCCATTTGCAATGCCGAGCTCCGTGAACCCATATCCCATCACTCGAGACAATTCCATTC
CATTTGGCGCATTTGACTACAAGAGCAATTTCCACTACTCTTACGACAACCTTGAATTTCAATGGTCTCAGTATTC
CACAGCTTTCACGGGAGCTGGAGAGCCGTAAGTCACTATAACCGAGTATTTGCTGGTTTTCATGTTGCATGGCATCA
AAGACACTGTCCCTCGTCAAGTTCTACATTTGCCTCTCCAATGGCGACTGTTCCAATTATGCGGGAGAGTTCTTAT
TCTTGGGGGACCCCGCTGAAATGCCATGGACTTACAATCACCTTTACAAATATGAAATCACTGACGTGTTGGATA
GCCTGCACCTGCATCATGAGGACCGGTACTCCATCAAGTACGAAGTGTATGACCTTAACAACCAGAACACGGGCA
CCCAACCCTACCCTGAACCGACCATCTTGCACGAGCCATCATCAG

NnH1-d

GTGCAGGTGTTGATCATGAGTACGAGGAAGTTGTTACCACAGCCAGCCACATAAGAAAAGATATCAACAATTTGA
ATCCAGGGGAGATTGAAAGTCTGAGGGCTGCGTTTGGACAAATTAGAAACGATGGAACATATGCAAAGATCGCTC
AAGCACACGGCAAACCAGTTTTGTGTAATGGCAAAGGATGTTGTGTACATGGAATGGCCACCTTCCCTCACTGGC
ATAGATTGTATGAAGTGCAAGTAGAAAATGCACCTTCTGGAACACGGATCAGCCGTTGCCGTACCATACTGGGACT
GGACGGAGCCCATCAAGTCACTACCCCATCTACTGAGCGACCCACGTTCTTTAATTTCCCGCTCTCATGAATTTG
ATGTCAATCCCTTCTTTAGTGGGGATATCCCTGGTGAAAACCTCAGACACCTCACGAGACCCACAGCCAGACTTT
TCAACAACGACTATTTCTATGACAATATGCTGTTGGCATTGAAACAAACAGCTTCTGTGACTTCGAAATTCAGA
TGGAGTTGGTCCATAATGCTCTTCATTCTGGATAGGAGGGCGTGCTCATTATTCCCTTTCTTCATTGGACTACA
CGGCTTTCGACCCAGCTTTCTTTATTTCATCATGCAAATGTCGACCGTCTCTGGGCAATTTGGCAGGAGTTACAGC
GTTACCGGAAGTTACCGTATAACAAAGCCGATTGCTCCATAAACCTGATGAGAAAACCACTGTACCCTTTGCTG
GTGACGAAAACAAAGACACTCTAACCAAAAAGAAGCAGTCAACCCGCAAGATGTTTTGACTATCGAAATAATCTTC
ATTACAAATATGACAACCTTGAGTTCCATCACATGAGCATCCCTGAGCTAGAAGCTACCCTCGATGCCCGAAAAT
CACGTGATCGGGTTTTTGGCTGGCTTTTTGCTGCATAATATTGGAACCTTCAGCTGACGTGAGATTTATATATGTG
TTCTAAAGGTGATGGCTATAAAGACTGCAATAACTATGCTGGAGTATTTTTCAGTCTTGGTGGGGAGGTTGAGA
TGCCGTTTGTGTTTACAGGCTCTACAAGTACGACATTACTCCGACCATCCATTCCCTGGGTCTTAATCCGGATG
CCAGCGATTTGACCTGAAAGTTGCTATTTCATGGCGTTAATGGGGCCATTTTGTAGTTCTGATGCTCTTCCAGAC
CAACAATTTCTGTTACAGCCTGGCAGGG

NnH1-e

GAGCCGCTGCCCCACATCACGGAGGATCGGACGTACAGTTAGAAAAGAAATTAATACACTTACTCCCTTGGAGG
TTGATAGTTTAATGAAGGCGATGCGTCTTCAAGAAGACAGTTCTCAAACGGGTATCAAGGAATCGCTTCTT
TCCATGCTGTGCCCGCGCTTTGCCCTTCAACCGCCGCGCTAATCGCTTTGCCTGTTGCGTTCATGGGATGGCAA
CATTTCCTCAGTGGCATAGACTACATGTCTGACAAATGGAACAAGCTCTGAAAGATCATGGCGCTACAGTTGGTC
TGCCACTCTGGGATTGGACTCGACCTATGACATCACTTCCAGATTTCTTCAATGATGGTCAGTACACCGATGCAC
GAACCGGAGTGACTTTTGACAACCCTTTCATCATGCTGATATTAATTTTGGAGGTGCCGGGTACATACCAGAC
GCAGCCCCAACGAACAGAGGTTGTTTTGAGGATCCAAGCCTTGGCTATAACACTTGGCTATTTGAGAATGTGATAC
TGGCACTTGAACAGGATAACTATTGTGACTTTGAAGTTCAGTTTGAAGTCATGCATAATGCCATTCATGCCTGGA
TTGGTGGTGGCGAGCTAAGGTCAATGGGCCATCTTCATTACGCTTCCCTACGACCCGATTTTCTACATTCATCACT
CCACTACAGACAGAATATTGCTATGTGGCAGGCATTGCAAAACCACAGAGGTCTAGACGGTGAACATCCAAAT
GTGCTCTGGAGGTGATGAAAGAAAAGCTAAAACCTTTTCAGCTTCCGAAAGCCATAACAACCTTAATCCTGTGACGG
CTGAATACTCCAAGCCTGGAGACACATTCGATTTTAAAGAACCATTTCCACTACGACTTTGACAAAACCTGAAATTTG
GTGGCATGTCTGCGGCACAACCTGGATACCTTCATTCAAGAGAGAAAAGAAAGAGACCGGGTGTGTTGCTGGCTTCC
TTTTAGCTGGATTCAAATGTCCGCTACAGTCAAATTCGAAGTATGTAAGAGGACGGCACATGTCAGGCAGGCG
GCAGCTTTGAAGTTCTCGGTGGTACACTTGAATGCCTTGGCGATTTGACCGTTTATATAAATACGAGATCACTG
ATGTACTAGACAAGATGGATATTGCTATGATGACCCATTCATTTTGAATGGACAGTTACACCAACTATGCCTG
GCGATACTATCGACTCAAATCCGATCTCAGAGCCATCCGTCAATTTGTACCCGCTATAG

NnH1-f

TTGATCACAATGAAGACAAATTTGCACACAACCAAGTAAGACGTAACATTAATGAGCTTGGATGAAGCAGACGTCA
GAAGTTTAAGCTCGGCTCTGACCGATCTGATGGCAGATGAGGACAAAGATGGCTTCCAAGCAATCGCTAGATTCC
ATGGCATGCCTGTACAGTGTGGTATGTCGCTTGTGTGTCATCACGGTATGCCGACCTTTCCGCACTGGCACAGAT
TAATTAAGTGTGAGTTTGGAGATGGCACTCCAACGCCACGGATCTAGCTCAGGCCTACCCTACTGGGACTGGACAG
AAAAAATGGACGCTTTGCCACATCTTCTGACTGAACCCGAATATTACGATGCGTGGACAGATAAGGTTGTGCCCA
ATCCATTTGCAAGAGGCTACATTGAAAGCGAAGACACATACACCGTTCCGGACGTTCCGGAACGAGTTCAAATTTAT
TCGATAATGCACCTGATGCCAAACATTTCTATCCTGTTTAAACAGCGTCATGTACGCTCTTGGACAGGAAGACTTCT
GCGATTTCCAGGTTCCAATTTGAGGTGATCCACAATGCTATTCACTTCCCTTATAGGTGGATTCCAAACTTACGCC
TGTCTTCACTTCAATTATTCTTCATACGACCTCTTTTCTATATTACCACGCAAACGTTGACAGGATATGGGCGAG
TGTGGCAGGAGCTACAGAAGGCTCGTGGGATGCCGCACAACCTCCGCTAACTGTGCTCTCAACCTTATGTCAGAAC

CAATGCATCCTTTTGACATGGGCATCAATATTAACAAGGTCACGAAAAGGCACGCTACTCCAAGTACAGTGTGTTG
 ACTTTGAAGACTTCGGCTACACATATGACAGCTTTAAGATCGGTGGTTTTGTCCCTGAGTGAAATACAGGAGGAAA
 TTGACAATCGTCGAAATCATGATAGAGTATTCCGCCGGCTTTCTTTTATCGGGAATCAAAAACATCTGCCCTCGTTC
 ACTTTCATCTCTGTAAAAGTGATGATGACTGTATAAAAAGCAGGTGAATTTGGCGTCCTGGGCGGGGAATTCGAAA
 TGCCATGGGCGTTCGACAGACTGTACAAATATGAAATTACCAGTGCGGTTAAGGAAGCTGGGCTCAATCCTAATG
 ATGTCTTCAATGCAGAGGCGCGTTCATCTGAAGCTAGAAATTACAAAAGTAGACGGAACACAGATCCCTTCAT
 CTGAATTACACAAGCCAACACTATTATTTATGAACCAGCTCATG

NnH1-g

GACACGAATCCAGCGTAGGTGTGCGCCAGTCATGCTGGCCGTGGAGTAAGAAAGAATGTCAACACGTTAACGCCAT
 CTGAGATCGACAACCTTAAGGATGCAATGCGAGCTGTGCAAGCGGACAAAGGTGTGAATGGTTACCAGTCAATTG
 CTGCTTATCACGGTCTTCCGGCACAATGTGGGGATTATGCGTGTTCCTGCATGGCATGCCTACTTTCCACATT
 GGCACAGACTGTACGTAAGCAAATGGAAGATGCCCTGGCTGCCACGGGGCAGAAGTTGGGATGCCCTATTGGG
 ACTGGACTGCCGCTTTTACCAAACCTACCAGCCCTTGTGACCGATCCAAACGACAACCCATGGGTGCATGCTCACA
 TTGAATATTTGAACGAGGTCAACAAGAGCTCCGCGTCCCAACTCTTTAAGGATCCGGAACACAACGAGGGAT
 CGTTCCTTTTACCAGTGCATGCTCCTGGCATTGTAACAGACCGATTATTGCGATTTTGGAGTACAGTTTCGAGATGA
 CGCACAATGCTATCCACTCATGGACGGGTAGCGCCAGTCCTTATGGTCTTTCTTCCCTAGACTTTACTTCTTACG
 ATCCGTTATTCTATGTACACCACTCAAACACTGACCGTCTCTGGGCGATGTGGCAGGCGCTACAAAGGTTACAGG
 GCAAGCCATATAATACAGCCTATTGTGCGCTTGAACAGCTGAAGAAGCCCATTAGACCTTTCTCTGATGCATCCA
 ATCCCAACCCTGTGACCAGAGCACATGCCCGAGCATTGCGCTCTTCAACTATGAGGCGCTTAACTACCAATATG
 ATACACTTTCATTTAATGGAATGAGCATTCTGAGTTGGACGATCTCGTGCATGAGAGGCAAGAGAAGGATCGCA
 TTTTTGCAGCCTTTTTCGCTTGGAGGGATTAAAAAACATGCGACGTCAAATTTGATGTATGTAAAAGTGATGGTG
 AATGCAAATTTGCGGGAACATTTGCCATCTTGGGAAGCGAATACGAAATGCATTGGCAGGATGACCGGGCTTTCC
 GATACGATATCACCGACACAATGGAGGAACCTTCATCTGAAGCCTGAATCAGAGTTCACTATCAAGTTACATCTGG
 TACAGGCCGATGGGACAGAGCTCAGTTCCGACCTTGTGATTCTCCAGAGGTTATATTTGTTCTCGGTTTCAG

NnH1-h

CTACCCACGAACACCATACTGTACACGAAGACCATCGAGACGTCCTGCTCAGAAAAGAATCAATTCGTTGTCTC
 TCGAAGAGGCTCGAAGCTTACGCGACGCTCTTTACAAACTTCAAATGACCAGACAGAAAATGGTTTTGAGCATA
 TTGCGGGCTTTTCATGGTGAACCAATGTATGTCCGGAGGACAGTGAAAGCAAGTATGCTTGTGTGCCATGGTA
 TGCCGATTTTCCCACACTGGCACCAGGCTTCTAACTGTACAGTTTGGAGAGGTTTGGTCGATAATGGCGCGCTCA
 TCGGCTACCCTACTGGGACTGGACTGTCCCGTCCAAGGCTCTTCTTCCCTTTTGGCCGAGGAATCAAACAACC
 CCTTCTACAAGTATCACATTGGCTTTGCAAATACCGACACCGAGGGGACGTTCAAGATTTCTCTTTAACCAAC
 CAAGCTTTTACGAAAATACAACCTATCTCTACTATTTAGCCTTGACAACACTTGAAGAGGACAACCTATTGTGACT
 TTGAGGTACAGTTTGAAGTGCTTCAACGCAATGCACTGCTTTATTGGCGGGACAGGCGCCCATTTCTATGAATA
 CATTAGACTATTCCGCTTTTACCCTTTCTTCAATTATTATCATCATTCAAGTATCGATCGTATTTGGATAATCTGGA
 ATGAGCTTCAGAAATGAGACACAAGTCGTTTAGCTACGCTGAATGTACCAAGCATCATCTTGATCGACCACTTC
 ACCCATTTCAATTATGCTAGTGTCAACCACAACGAACCTCACACGAACCTATTCCATGCCTAATCAAGCCGCGACC
 AATCCGCTTTTGGTACTGGTATGATAATTTAGATATGAACCACCATACTGTAGCAGAACTCGCAGAAGAAATCA
 ACAGTCTACGAAACTCGGAGAGAGTATTGCTGGCTTTGTCTTACACGGTTTTGGAGCATCTGCTACCCGGAAGG
 TCTTTGTCAACGATCACTATGCCGGGACGTTTAAATGTTCTCGGGACAGAAAGGAAATGCCGTGGGCTACGAAC
 GGCTCTTCAAGTACGACATTACCGAGGTGCTAAGGGAGAATAACTTAAATGCTGGCCATAACGATATCACGTTCA
 GGTGTGAAGTGACGGCCCTTGATGGAACACAGCCTTGACCCCAATACTCTCTCCGATCCAGTCTCTGTTTTGC
 GCCAGCTAGGGTCAACTACGACGTAATCATCTTCCAGATGGCCCTACCAATCACAATCCGCCAGCCAAGGTTA
 TTGTGAAGAAGGGCACGAAACTCCAGTACCATCCCATGCGGCCATTGTTCAAATGGGTCTCTCCGACGCTGTGG
 CTGAATTAGGCAGCTACACGTCATGGTCCAAATGCATAGTGCCACCTTTCCGGCTATAGGCGGTACCAGTTTAAAC
 CCGTCTACAGCTTGAGCCCTGGAAACTACTACTTCTCTGCGCCACGGTAGAAATGTGCAAAACAAAACCGAAAAC
 TCATACTCGCCGTCGAAGAAGAA

3'UTR

TAAAATCACCCAGGAACGTCATCCAGCACACATTGCAAGAAATATTGGCAGACTGCTCTTCATGTATGTTACTCT
 GAAAGATGAATAGAGTTCAAACGCAGACAGGTCGCTATTGTCTTCGGATATGCATATAATTTGTTCTCTCTTGC
 ATTTGTCTGAAGCCAGCAACTTTATTTCTGCTCCTAAATTTGCAACGATGCCTGAGAGTATTTCTTATAGAAGTAT
 CTCGGATTTTGTAGCTATTTTAAATTTGAATACATAAAAATATATCATATTTATGTCATCTGTGATATCGGCATTTA
 ATCTTCAATAACGATATGTTGCCTAGTGGAGTAGTTATTGCTTCCAGGCTTGTCTCAAGTTTAAACAGTTGATGT
 ATTTGTATAGGAGGGAATCTTCCAGTCGATGTAGTCATAAGCTAATGTGATCCGGCTGTATATAGGTTATTTCAT
 ATTACATTCAATGTGCGATATTATTTTATGACATCATTTCCAAGGCAGGGATGGTTCCAAACGACTAAACTTTTCA
 CGGAAACGCTCGGCCAAGAGCGTCACCTACCTCGAATAAGAACAGAACACCGGACACACTATTAATTGGATAT
 TCCAAGAATATGCCGACTTTTGAAGACTTTATGGATATTTTCAGAAATTTGCCACTTGTGGTTTTTAAATTAATAAA

GTTGTGTTGGTGTAA
AA

Isoform 2

5' UTR

AGCTGGTACCTCCGGACGTTAGGTCGTTGCGAACCGCCAACACGAAG

Signalpeptid

ATGCGTCTGCCTTTCATAGTGCTGTTGCTAGCCTTGCAAGGCTGCTGCT

NnH2-a

CTTAAACGAAAGAATGTTGAACACCTAACAAACCTTGAGATCTTGGAGCTGCAACAAGCACTGGAAAATGTGGAG
AATGATCAAGGAGAAAATGGCTATGCGGCAATAGCGGGATACCATGGCTATCCGAACAACATTTGCCAGAAAAGAG
GATGGATCGCCAGTGGCTTGGCTGCGTTTACGGCAAGGCGGTTTTTCTCACTGGCACAGGCTTTACGTAGACCAG
ATGGAGCACGCTCTCAAATTCATGGTGCTACCACTGGGATAACCATACTGGGACTGGACGCAGCCCTTGACTAAA
CTTCTGATTTGGTCCAAGATGCATACTTCATTGATCCAGCCGGTGGAAAGGCCTCACCCCTAACTTTTGGCATGAG
GGAAAATTTGACGATAATCACACACAGACAGAGCTATAGATGATCGTCTGTATGAGCAGCCGGAAGAAGGTAC
TACACTCACATTATGGAGAAAATGCTGGCACTGGAACAGACTGATTACTGTCATTTTCGAGGTGCAGTTTCGAG
GTTGCCATAACGACATCCATTATCTAGTTGGAGGAGACCACTCTATGTGCGATGTCAAACCTTGAGTACACTTCC
TACGATCCCATTTTTTTCTCCATCACTCCAACGTGGACAGACTGTTTATTATATGGCAGAAGCTTCAGAGGAAG
CGTGGACTCCCGTGGGACCATGCCGACTGCGCCATTGACCAGATGCACGATCCACTTAAGCCTTTCTCTCTGGAT
TCCAACCATTTTCGCTGATACCAAGACACACTCAACAGGTGCCAAAGCGTTTCGACTGGAACGAATTAGACTATAAC
TATGATGACGTCGACGTGTTGAACGGCATGAGTCTCGACGAACTCGAACATTTGCTTGATGAAAGAAAAAGTCAT
GAAAGAGCATTTGCTAGTTTCCGTCTCCATGGAATTGGGGCTCAGCCAATGTTGGTGTAAATGTCTGCGTGCCG
GACCATGATGAGCAGCTAAGGATCACTGTGAACACGCTGGGGATGTTTTACACTGTGCTGGCAAATCCGAAATG
GAATGGGATTTCAACTTACCCTATTTATTTGAAGTAACCGATACAGTTCACAAAATGCATCTTGATTTCCATAGT
GCATGGTACATAGATATAGATTTACATTTCCGTAATGGCACCGAACTTCCGGCATCACTGCTTCCAAAAGCTACA
GCCGTTACCAACCACCTCCTGGTTCACATTGATA

NnH2-b

CTGCACCTCACCATGGTGATGTCCGTCTTCTGCACACTAGAAAGGACGTTGATCGCTTAAACCAGAGGAGGTCT
ACGAGCTTAGGAAAGCAATGGAACGCCTTCAGAGCGACCATTCATTGACGGTTATGACATGATTGCGGAGTATC
ATGGCCTTCCAGCAAAGTGCCCTCAACCAGATGCTAGCAAGAGATATGCGTGCTGTACCCACGGTATGCCGACGT
TCCCGCACTGGCATCGATTATACATGGTCCAGATGGAGCAGGCACCTTTGGCACGTTGGATCTCACATTGGACTGC
CTTATTGGGATTGGTCAAAGACAATAACTGAGTTGCCTCATATTGCCACAGACAAAACCTTCAAAGACCTAGAAA
GCGGATTAGATCATGATAATCCATTCTTGCAAGGGAATATCGCCTTCAAAGGTGCTGTAACGGACAGAGCAGTGG
ACAATAAAGTGTAAATAGCAACCACCTGTTTGGATCAAATGATGCTTTCGAGCAAGAGGATTTCTGTGACT
TCGAAGTCCAGTTTGAAGTAACGCATAATGAAATACATGCCTTGGTGGGTGGTAACCTTGATTACTCCATGGCTA
CCCTTCACTACACTGCATTTGACCCAATCTTCTACCTGCACCATTTCAAACGTGATCGACTCTGGGCCATTTGGC
AAGCGCTGCAGATTACCGAGAAAAGCCGTTTAAAGCTCACTGTGCCGCTTCTGCAACGTTTGGCCTTTAAAGC
CTTTTGCACTCGGCAGCCCTTTGAATACGAATGAGCTAACAAGCAGCCACGCTGTGCCACCAAGATATATGACT
ACCAGAACAGATTACATTATGATTATGACACTTTGGACTTTGCAAGTTTGTCAATTTGGAGAGCTGGAACATGAAA
TCCATGTCCATCAAAAAGAGTCAAGACTTTTGGCGGATTTCTACTTTCATGGACTTTGGAACCTCTGCAGTCCCAG
AAATTCACATTGACCGGGAGGGTCAAGATTCAATTGTTGCTGGAAGCTTCTACGTACTTGGTGGTTCTCAGGAGA
TGCCTTGGCGCTTTGACCGTCAAGTACAAACATGAAATCACTGATGTCTTGGCAGCTAATGGCATTGCACACGACG
ACGATTTCCACATTTCTTTGGAAGTACAGAGCTCGACGGCACACACGTTGGACTCACATAAAGTGCCTCACCCAA
CAGTCATCTACGAACCTTCGCATG

NnH2-c

GTGCAGAATACAAAGATCATGCAGATGAGTATCATACCAGAAAGAACGTCGACACGCTGAGTGATGATGAAGTGT
TGAGTATTTCAAAGGCAATGGCAAAACTGCAAGAAGATCACACTCACTACGGATTTCAAAGAAATGGGAGAATACC
ATGGCTTTACCAAATGGTGTGATGAGTGGCGGTAATATGTCGCTTGGTGGCTCATGGCATGTCCGTTTTTCTC
ACTGGCACCGATTGCTAACAGAACAGTTTGGAGCCGGATTGAATAGGGATGGCTTTAATGGAGGCCTACCCTACT
GGGATTGGACCGTACCAATGAAAAGCTGCCACATCTTGCCACTGATGTAAAGTACAGTGATGATGACGGACAGC
ACGACAATCCGTTCTCAAATTTGGTTACACCGAAGATGGTACAGTGCACCTTTACGTACAGTAGTGAACAATG
ATTTGTATGAAGACCCAGGGTATGGAAAATATACAAAGATAGCTGAGCAAGTTCTGCTGGCATTGAAACAAGAAG
ACTTTTGTCTCTTTGAGATTGATTTGAAATCGCCCAACTTTCATTTCATGTGCTGGTTCGGGGGATCGATGGGGT
CTCTGAAATACACCGCATTTGATCCACTGTTTTATCTTCATCATTCCAACACTGATAGGATTTGGGCCATCTGGC

AGGCGCTCCAGAAATACCGTGGTAAACAGTATGATAGAGCCTTCTGTGATCTCGAGGCAATGAATAAACCCCTTGG
AGCCTTTCTCTCAAGCTTTCGAATGAATACCACATTACCAGAGACCATGCCAGTCCGTCAGAGGTTTTCAATTACA
AAAGCGTTTTTCCACTACGATTACGACAACCTTGAATTTAACGGCATGTCCATTCCCCAGCTGTCAAGAGAGGTTG
AAAGCCGAAAGTACATGACCGAGTGTGCTGCTTTCTTCTGACGGAATCGGGAAGTCCGGCACTTGGCACCT
TCGCAATCAATGGCCATGAAGCAGGGCATTCTTTATTCTCGGAGATGAAAATGAGATGCCCTGGCAATACCACA
AAGTGTACAAATTCGACGTCACATCAACATTAGACAAGTTTAAACATTCATCACGACGAGCCTATGAGTATAACGT
ACACGGTTCAGATCTTGAAGGAACCTGACCTAGGTACCCATATGAGGTTTCCGTCATTCATCAAGTAGCTAGAG
GAACGT

NnH2-d

ACCGGGGAGACGAAGATGAGTTTGAAGAAGTTATCACTACTGCCAGTCACATCAGAAAGAACATTAACAGCCTGA
CGGACGGTGAAATGGAGAGTCTCAGGGCGGCATTCTGGATATTCAGAAAAGAAGGAATCTATGAAGAAATGCTA
ATTTTCACGGAAAACCAGGTTTGTGTAATGGCAAAGGATGTTGCGTCCATGGAATGGCCACATTCCCTCACTGGC
ACAGACTATACGAGGTACAAGTGAAGACGAACTTCTACAGCATGGTTCAACCGTAGCCGTTCCCTACTGGGATT
GGACGGAACCAATCAAAACCGTACCGAAATTCCTGAGTAGCAATTCCTACTTTAATTCGGAAGTCTTGAATTCG
ACGACAATCCATTTTTCCATGGCACATACCAGGGTCATACCACACAGCGAGATTATCAACCCAGGCTTTTCAATA
CCGATTATTTCTATGAAGGGATGATGCTGGCTTTTGAGGAAAACAAATTTCTGTGACTTTGAAATTCAGATGGAAA
TGATTACAACGCTGTACTCATGGATCGGAGGACGCGCAGAATATTCATGTCTTCACTTGGACTACACAGCTT
TTGATCCAATATTTTTCATACACCACGCAAACGTGGATCGCTTGTGGGCTATTTGGCAAGAACTACAGCGGTACA
GGGAGTTGCCATACAAGACGGCTGACTGTGCAGTCAATCTTATGAGTAAAGCACTCCGACCTTTTGCAGATGATT
CAAATAAAGACACGGTTACCCATGACCACAGTATTCCAGCAAGCGTATTTGACTACCAGAACGCACTCCACTATA
AATATGACAATCTAGAGTTCCATCATATGAGCATCCAAGAGCTGGAAAAAACCTGGAAGAGAGAAAACACCATG
ACCGTATATTTGCGGGATTTTTGTTGCACAATATTGGGCAATCTGCCAATGTTGAGGTTTATATATGCGTTTCTA
AAAGCAACGGCAAAGAGGACTGTGACAATTTTGCAGGCATATTCTCAGTTCTTGGAGGCAACGTTGAAATGCCAT
TTGTATTTGACCGCCTATACAAGCTCGATATAACTTCAGCAGTTCACTTCACTGGGTCTGAGTAACGACGCACATG
ATTTCCACCTGAAGACCGTTATTCATGCAGTGAATGGCACGGATATAGATAGCCATGCCTTGCCGTCTCCAACAA
TCATCTTCGAGCCCCGAACAG

NnH2-e

AAGATCATGTAGATCACAGCCACGATGAGAAGCATTGGTAAGGAAAAGATATCACACACCTTACCAACGAAGAGG
TCCACAGTCTTATGCATGCAATGAGGCGGCTGCAAGAGGATCATTCTGCCAATGGGTATCAGTCGATTGCCTCGT
TCCATGCGCTGCCACCTCTATGTCCTTCTCCTGCCATTCCGATCGATATGCATGCTGTGTCCATGGAATGGCCA
CTTTCCCACTGTGGCATAGGTTGTATTTGGTACAAATGGAAGACGCTATGGATGAGCATGGTACTACTCTCGGTT
TGCCTTACTGGGATGGACTCGTTCTATGTCGAGCTTCCACTTTTTGCTGATGAAAAAGAAATCTGGATG
GAGTGAATATGACAATCCGTTTACCATGCCGCTATCGAATTTCTTAGGGGAAGGGATCGATACAGAGCGCGATC
CTCAAGGGGACCACCTCTTTGCCCAATTACAAGCGGTACCATAACAGATTTATTCAATAAGGTTATGCTTGCTC
TCGAGCAGGAAGACTTTTTGCGATTTTTGAAGTACAGTTTCGAGCTGGTGCACAACGCGATCCACGCCTGGATCGGAG
GAGCAAAAAGAACTCACTTGGTCACTTCCACTTCGCGTGTATGACCCTGTTTTCTACTTGCACCACTCCATGG
TTGACAGAATTTGGCTGTATGGCAGGCCTTGCAAGAATACCGCGGACACTCTGCTGATCATGTAATTTGCGCCC
TGGAAGTCATGCACGAACCCCTGAAACCGTTTTAGCTTCCGCTCTCCGTATAATCTCAACCCATCAACCAAACAGT
ATTTACTCCCGAAGATACATTTGACTACAAACACCATTTTTATTATGAGTATGACAGTCTGGAAATTTGGAGGAA
TGTCTATAGCGCAGATCAATGGCTATCTAGAAGAGGAAAAGGAGCATGACCGTGTCTTCGCCGTTTTCTTCTCC
ATGGCTTCGGGCGCTCGGCACACGTCTCATTTTTCTGTGTGTGACGATCATCACTCTTGGCATTCTGCGGGCAGCT
TCGATGTCTTAGGAGGCAGTGCAGAAATGCCCTGGCGATTTCGATCGCCTTTTCAAATATGACATAACCCATGCTC
TAGAAGACAATCACATGCGGTACGACGAACATTTACTTTCAAATCAGTGTGCGGATCCAGTCACTGGAGCAG
ATATTGCTGCTGAAGCTCATCTTCTTACCATCTGTAATATTTGTTTCTGGTACTG

NnH2-f

GTGACCACAATACCGACGCTTTCCAGACAACCGTATAAGACATAACATCAATGACCTAACTGAACGTGATACCA
GAAGTCTTAGCTCGGCCCTCCGTGAGCTAATGGCCGACGACGGGAAGGACGGATTCCAGTCTATTGCGAGCTTCC
ATGGATATCCTGCGCAGTGCAGGAGACTTGGCTTGGCTGCCACCATGGAATGCCACTTTCCACATTGGCACAGAT
TGATAGCTGCTCAGTTTGGAGCTGCGCTCAGACGTCACGGTTCCAGTACTGCGCTTCTTACTGGGATTGGACAC
AAAAGATGGATAGCCTACCATCACTGTTGACTGCTCCAGGATTTACAATGTATGGGGGCACGGCGATGATAGTG
TCCTAAACAACCCGTTTTCTAAGAGGTTCCATTGATAGCGACACTGTTACTGTACGGCAGGTACAGTCCGAGCTCT
TTAACCTCGGACCAGACTCGAAGCACTCTATTCTTTATGACGGGGTTCTCTATGCTCTGGAGCAAACCGATTCT
GTGATTTTGAAGTACAATTCGAATTTGGCACACAACGCTATACTACTACCTGGTGGGTGGACATCAGAAATATTCAA
TGTGCTCCCTGAGCTACACGGCGTATGATCCACCTTTCTACATTCATCACTCTAACGTAGATAGGATCTGGGCAA
TCTGGCAAGAGCTTCAAAGCATCGTCAATTTACCATTCCGACTCCGCTCATTGTGCACTTAACTCGATGGAAGAAC
CAATGATGCCGTTTTAGTGACGCTGACAAGAATATCAATAAAAAGACAAGATCACATAGCGTCCCTAGCACGGTAT

TTGACTACGAGGATCTAGGCTATACCTACGATAATTTGAAATTCGATGGCATGTCAATTGATGAATTAGACCATG
 CCATTGATGAACGAAGAAGTCACGCCAGAGTATTTATCGGATTTTTGCTAAGCGGCTTCCATAAGTCTGCTGACC
 TTCATTTTCGACGTTTTGTCCGGAAGGAGGGGAGTGTATACATGCCGGTATGTTCTTTCGTACTCGGGGGGAGACATAG
 AAATGCCTTGGAAAGTTTGACCGACAATACAAATACGATATAACGCCTGCTCTGAAAAGAAGCCGGTATAACCCCCG
 AAGATGTATTAACCATGACGCACACTTCCACGTGGAAATCAAAATCGAAACTGTGGATGGACAGACACTTCCAG
 GGTCAACATTCGCTCACTCTATCATCTATGACCCACCTCATA

NnH2-g

GTGCCGGTGATCATGATCCTGACCCGACACTGAGTGGTCACGGTGTAAGGAAGAATATTGACACACTAAGTTCTT
 CTGAAATATCTTCACTTAGAGATGCTTTAGCAGCAGTCCAGGCCGACAAGGGTCTAATGGGGTTCAGAAAATTG
 CTGCCTACCACGGTGTACCTGCTATGTGTGGTGACTTTGCCTGCTGCATGCATGGTATGGCAACATTTCCACATT
 GGCATAGGTTGTACGTTAAACAGATGGAGGATGCTCTTGAAGCGCACGGAGCCAAAGTTGGAATCCCATATTGGG
 ATTTGACTACCGCTTTTGGAGTCGTTGCCACATTTTTCAATAAGGAAGAGAACAATCCTTTCCATCATGGCACGA
 TTGACTTTATGCATGAACGAACCCCGTGCACCCGAGCCAAATTTGTTTCAGTGACCCAGAACATAGCGAGGGAT
 CATTCTTTTACAGACAGATACTTTTGGCCTTTCGAGCAAACCGATTACTGCGACTTTGAGGTGCAGTTTGAGATGA
 CCCACAACGCTTTTACACTCTTGGCTTGGTGGCCCAAGCAAGTTTTGGACTTTCCAGTCTTGATTACACCCGCTATG
 ATCCACTCTTTTATATTACCATGCTAATGTAGACCGTCTTTGGGCGATATGGCAGGCTTTGCAGCATCACAGAG
 GACACGTTTATGATACAGCTTACTGTGCCCTAGAGACACTAAAGACGCCCATGCGGCCATTTTCAGACAGCTCAA
 ACCCAATAAAGACACGAGGGCGCATTCTAGACCCATGGATGTGTTAATTACGACACATTGAACTATCAGTATG
 ACAACCTTCGCTTCCATGGTATGTCTATTCCCAGTCTTTCAGCATGAAACAGACGGAGCACGACCCGAG
 TATTTGCAATGTTCTTTTGCATGGCATTAAAGAAAACCGTTGACGTGAACTTTGATCTTTGTACAGTGACGAGG
 GAGGTACAGGGAATGCAGATTTGCCGGTCTTTTGGCCTTTCGAGCATCTTGGGCGAGCAGCAGAGATGCCTTGGCATTACG
 ACAGGCTCTTCAAATATGATATAACAGACCGCATGAAAGAGCTACATCTCAACGCTGCCAGGGATAAGTTTCGAGA
 TTAAGCTTCATCTGGGCGAGGTTGACGGTACTGAAGTGCCTTCAGATGTCAATTCAGCACCAGAGGTCGCTTTTC
 AGCCAGGCAAAG

NnH2-h

CCCATAAACACACCCTGTGCACGCTCATGATGACCTACGGGACATGTACATAAGAAAGAATATAAACGACCTGT
 CCTACAGTGAGACGCTCAATTTGAAAGATGCTCTCCTCAAGTACAAAATGATCAGACTCATAACGGATTCGAGT
 ATACTGCTGGATTCCATGGACAGCCTCTAATGTGCCACATGACGGCGATGAAAAGTACGCTTGTGTGCTCACG
 GTATGCCCATTTTCCCACACTGGCATCGTCTCTTACAGTCCAGTTTGAGAAAGGTCTGGAAGCGCATGGGTCTC
 ATCTGGGCTTACCATACTGGGACTGGACAGAGGATGTGACGCTCTACCGATGTTATTTCGAGATGATTCACACG
 GTAACCCATACCACATTTTACCTCACCTCCGCTGGAACCGATACTCTTCGAAATGTTTCGAAATGTAATAATTTCT
 ATCAGCCCACCTTCCACGGGAAATATCACTACCTGTACTACCTCACCATGCTGACATTGGAAGAGAATAATTTCT
 GCGATTTTCGAGGTACAATTTGAAGTCTGCACAACGCCATGCACTACTTCATCGGCGGTAACCTCGGATTAACCTCA
 TGAATACATTGGACTATTTCGGCATTGATCCGTTCTTTATGATACACCATTCCACCATAGACCGTCTTTGGGTTA
 TTTGGCAGCAACTGCAGAACTGCGGCACAAGCCCTTTAACTATGCTGCATGCGCAGACCACTTCCCTTGACGAAC
 CACTACATCCATTTAATTACGCAGATGAAAATCCAAACGATCTAACCAGCACACATTCCATGCCAGTGAGGTGT
 TTGATCAAACGCTTGGTTACTGGTACGATAATCTTGCCTTACCACCACACACTTGAAGAGATTGAAGATG
 AGATACATCACCTAAAAGACTTTGAGAGAATCTTCGCTGGTTTTGTATTGCATGGTATGGGTGAGTCACTAAAC
 TGGTATTCTTCGTCGATGGGACAAAAGCCGGATTCTTCAATCTTCTGGGAGGAGAGAAAGAAATGCCGTGGGCAT
 TTGAGCGTCTATAACAAGTACGATATTACAGAAGTGGTCCACAACCTTGGCAAGCATGCCGAAGATACCTTCCAGT
 TTTTCGTACGAACCTTACGACGTACACGGAACCTAAGATGACTTTTCGACACTCCCCATTCCATTACCAGTAATTG
 TTCAACGTCAGCAAGTCCCATCACGACATCGTCAGGTTCAACCTAATGGACCACCCGCCAGTGAAAAGTAATCG
 TGAACCCAGGAACCTCGAGTTGAATTCATGAAACAGAGGAACACCCCGGTGAGCACGTGGTTGAGATGCATACCT
 ATACCTCATGGAACAACCTGCAATATTCCTCCTTTTCGGGTACCGCAAGCATGAATTCATGAAGAATTTGCGCTGA
 CGCATGGTGACTACTACTTTTCCGAAAATAGCGTCGCCCACTGCAAAGACGGTTATCGTGTGCATGTCCATATAG
 AGGAACATCCT

3' UTR

TGAGAAACACGGACTGAAGTTAAATGTTTCACATATATAAACGCATTTAcGGtGGTAACTTTgACGCTTTATTcG
 GATAAATGTTAAATAATAAAAAGTaTTTAATAAGCCAGTGTGACAGCTACATGTTTgGTAAGtGCGATTATGA
 TAgAGCTTAAGCTTCaCCCTATCgATGACTGtGcGtGCGCAaCATTCCATGTGAATCGAgCCTCGTATTGGtGCC
 CGAAaCAAGTAaCaAaCAGACGtGGAATcTAATAGaCATTGATATATGATATcTTCTGTAGGCTGTGATAAAG
 TgACaCGTCACTGTTTTcTCGATTTCGCaCAGTAACATAcTGATaCaCCGGACTGTcTGATgATgAAAGTATAACG
 TTGCCCTCTTGTGTTAATGAAACAATGTTTTGcTGAgAAAGCTACCCAGTTATATTTAGTGaCGGCTCaCaCGT
 TTGAATTGCAAAATcTATTTTCAAATACTGAGGCTCAATATCCATTAgAgATAAACTATGaTTTcTaCAAAACAT
 CaCTATTGATGAGCATGCTGTAtATAgAAAGTACTGCATTTAAGTTTTGTGTGATATGAACGAgAATAAAATATT
 ATGTTTCATAA

Nautilus pompilius**5'UTR**

CCAGGGTCTGTGATTTGGGAAAAAAAAATCGCATGAATTGGCACGCCCTGCAAAGGAGC

Signalpeptid

ATGGCGACTCACTGGCACAGCTTGCTGCTGTTCTCTCTGCAGCTCCTTGTCTTCACTTATGCT

NpH-a

ACTTCTGACCCACCAATATCCGTA AAAATGTGGCTGATTTAACTCATGATGTGGCACTGAATTTGCAGATAGCT
CTGAGGACAATGCAAGATGATAACTCTCAATTGGTTTTCCAGGCAGTTGCAGCTTACCATGGAGAACCTGCATCG
TGTATAGATAGTCATGAAAATCTGGTCGTGTGCTGTCTTCATGGCATGCCACATTTCCCATTTGGCACAGATTG
TATACGACTCACTTGGAAACAAAGTCTGCTCGCTCTTGGTACCACCCTTGGCTTACCCTACTGGGATTGGACCCAG
CCGATGACCCACTTGCCCAACATCGTACAGCATCCCCTTTTCATTGACCCGAATGGGGGAAAGCCAAAAAAAT
GTGTTTTATTCTGGAACAATTGGATTTAAGAAGATGCAAACGGCCCGTGCCGTGCAGGAGCGCCTCTTTAGTCAA
CCCGAACCTGGCCACCACACCTTCTGTTTGAAGGTATCCTCGACGCCCTCGAGCAGACAGACTACTGTCAATTT
GAAGTACAGTTTGGATAATCCACAACGCCATCCACTATTTGGTTGGAGGTGAGTTTCCGCACTCCATGTATCC
CTCGAGTTCACATCATATGACCCACTCTTTTTCTCCATCACTCCAACGTGACCCGTCTATTTTCCATCTGGCAG
GCGCTGCAGCGACACCGGAGGACTGCCAGTGGGCATTCCAACGTGCGGAAGGAAGTGTTCACGGTGCCAATGAAG
CCGTTCAACGAAGATTCCAATCCGATCCAGCTGACCCACGACCACGCCCTGCCAGCCAGCTGTTTGACCACACC
AAGTTGTTATATCAGTATGACGACTTGACTCTGAATGGCTTAAACATCACGCAGGTCCAAGAACTCATCGAGAAG
AGACGCTCGCATGCACGTGCTTTTTGCCAGTTTTAGACTTAGTGGCATTACACGTCCGCCAACGTTAGGGTGCAC
GTGTGTGTACGCATCGATGACGACAAGTACACGATGACTGCGACCACGTGGCCGGTAACTTCTTTATCTTGGGA
GGCGCTCGTAAAATGGAATGGCATTACCACTACCCGTACCGCTTCGATATCACCAGCACCGTGCAAGAGCTCGGA
ATAGCTCTGGACAGCAACTACTACGTAGACATTGATCTGATCGCAATCAATGGAACCCCTTGTCTTCCAGCCTG
ATCCCAACCCACAGTGGACTACCAGCCTGCACCAGGCTCTTCTGACC

NpH-b

CACCCATGCGCCAGATTGACAGAGAAAAATTGGTAGTGAGGAAAGATTTACGCCGTCTTCACGCACAGAAAGAGT
TTGGTCTGAGGCAAGCGATGGCGCGCTTTATGAAAGACGAGTCTATCGATGGCTTCCAGGCTCTGGCTGAGTACC
ACGGTCTGCCTGCCCGCTGTCTGACTCCAGAGGGTAATCGCATTGCTTGTGCTGCATTCATGGCATGGCTACTTTTC
CACACTGGCACCGGCTGTTTTGACTGCAGGTAGAGGATGCTCTTATTTCGCCGAGGATCACCCATCGGAATTCCTT
ATTGGGACTGGGCCCGCCAATGATCAGTCTGCCGCATCTTATTGCCGATGAGACCTATATCAATCCATACAGCA
ACAAAAGTGTTCCTAATCCGTTTACCATGGTTCCATAGATTTTTCTGCATGACCATATCACGACGCAGAGAGATA
TCAAGCAGGAGACGCTGTTTGGCAACCTGCGTTTTGGCGACCACACATATCTCTTTGACGGTTTAAATGTACGCC
TTGAGCAAGATGACTTTTTGTGACTTTGAGATCCAGTTTTGAAATTGTGCACAATGGCATCCACGCTTGGACTGGTG
GCCAACAACCTACTCTATGTCTGCTTTTGCACCTTCACTTCTTTTGTATCCTTTATTCTTTCTCCACCATTCCAATG
TAGATCGTATCTGGGCGATATGGCAAGCTCTACAGATCTACCGCGGAAAACACTACCTGGCGCACTGCGCGAACT
CTGAGGTACACAGTCCAATGAGACCATTTTTCTTTCCCGTCTCCACGCAATCCAAACCCAGGACCTTTACCCATG
CCACTCCGACAGACATCTATGACTATGAAGCCGAGCTTGGCTATACATTTGACACACTGGATTTTGGAGGCAGGT
CCATTCCTGACCTACAGAACGAGATTGAAGAGCACCAAGACATGACCGTACTTTTTGCTGGTTTTCTTCTTCTGGG
GCATTCACACCTCAACTAATGGGAAGGTCTTTGTGGATGTCATAGGGCAGGCTACTTACAATGCTGGCACGATTG
CAATTCGGGTGGGACTAAGGAAATGACCTGGAGATTTGACCGCCTTTATCACTTTGAGATTTCCGAAGCCCTCA
AGGCTTTGGGAAAACCTGCTGATGATGAATTCTCACTTACGTA AAAATTCATGATGTCAATGGCAGCAGATTGT
CTAATGACATTATTCCAGCACCAACATCATCTTTGTTCCAGCAC

NpH-c

ATGTAAAAGTATGAATATCAGCCATAAAGGTCATACCAGAAGAAACATCAACAGCCTGACTCAAGAAAGCTTAT
ACGAGCTACGGCAAGCTCTCACTTCTTTTCATGGCTGACACTGAGAATACTGGGTTCCAAAGATATGCTGCCTTCC
ATGGATTCCCGAGTGGTGCCATCTCCTGATGCTGAACACAAAATTTGCATGTTGCGTGCATGGCATGCCTACCT
TTGTACATTGGCATCGACTGCTGACCATCCAGTTTGGAGAACGGTATCAGAAAACCATGGCTACCAATGTGGCTTAC
CATACTGGGACTGGACTGAGGCCATCACGCATCTCCCCGAAAGTTTTGACGGCTGCTAAGTACACCGACCCACATT
CTAATGAAATGCACCACAACCCACTTCACAATGGTCACATTGACTCTGTGAATGCCGACACCATGAGAAAACATAA
ATGAGAAGTTGTTTGGCAACCGGAATTTGGCCATTTCACTCTTCTGGCCAACAGGTGATCCTAGCTTTGGAGC
AAGAAAACCTCTGTGACTTTTTAGTGCAGTTTTGAAATTTCTCATAATGAAATCCATGCCTTGGTAGGTGGAACCG
AACCCATTTCCATGGCATCGCTGACCTACACTGCCTTTGACCCTCTGTTTCATGCTTACCACCTCTAACGTGGACA
GAATTTGGGCCATCTGGCAATCCCTCCAACAGTACCGAGGACATCCACACAAGTCTGCTAACTGTGCTCTGCAAC
AGCTTCATCAACCCCTGTCTCTTTTCACTAACCAGTGAAGTCAATCCAGACCCAGAAAACCCGCGAACACTCTA
AACCAATGGATGTTTTTCGACTACGAGCACAACCTTTCACTACCATTATGACAACCTTTGAACTACTCGGAATGAGCA
TCCCTCAGCTGTCTCGGGAGATTAACCGGCGCAGGAGCCGAAAACAGGGTGTTTGCAGGGTTCATGCTTCATGGAT

TCAAAAAGTCCGGCCCTGGTCAGTTTTAGCATTCTCCACCACCAAACCGACGAGACATATGCTGGAGAGTTCTATA
TTCTGGGTAGTGAAGACGAGATGCCATGGCACTATGATAGATTGTACAGATACGAAATCACTGACATATTAATG
AACTCCACCTACAATACACTGATCCCTTACGAATTACATACAGAATTAACGATCTACATAACAAAAGTGGTTGAGG
GAGAAGAGTTTTCGCCAACCTGTGTTGTATGTGCCGGCTCTTG

NpH-d

GTACCTATGGAACCTCAGACAAAATGGCGGGAGCCAGTGACCAGCGCCAGTGAATCAGGAAAGATTTGAACACGT
TGACTGACGGAGAACCTGGAGAGCTTGAGAAATGCTTTCCTTCGTCTGCAGGAAGAAGGTGCCTATGAGCCAATTG
CTGCTTTCATGGCGTTCCAGCAAAGTGTAGAGGTGAAGATGGCAACATTTACACGTGCTGCGTGCACGGCATGC
CAACATTCCTCACTGGCACAGACTGTACGTTATTCAGGTAGAACATGCTCTGCGGGAACGAGGCTCTGGGGTGT
CTGTGCCCTACTGGGACTGGACCAAACGTTTTAACCACTTACCAGCATTGATGGACGAATCCACATTCTACAAC
CTCGAAAAACGAAATGAACACCAACCCTTTCATAGGGGCTCAATCTCCTTCATTAATTTCGCACACAAGCAGAG
ACTTTCAGCCAGAACCTGTTCAACAGTGACTACTTATATGAAAACACTCTACTGGCATTAGAGCAGAATGATTTCT
GCAACTTCGAGGTCCAGTTAGAGGTCTTGCACAATGCAATTCATGCCTGGATTGGTGGACGAGACACATATTCTA
TGTCTTCTCTTGACTATGCTGCCTATGATCCAATCTTTTTTCAATACCATTCTACCCTTGACAGAATATGGGCAA
TTTGGCAAGAGTTGCAACGTTATCGAGGTCTGCCTTACAACGAGGCTAACTGCGCTCTTCCACTAATGAATCAGC
ATCTACGACCATTTAATAATGTCTCTGTTAACACGACCGCAACACCTTAACTTGAACAAGCCTAATGATGCCT
TTGATTACCAGAACCATTTCCACTACCGCTATGACAACCTGGACTTTCATGGTCTTCTATCCCTCAGTTAGAGC
ACGAATTACACGAGAGGCAGACTCACGATCGGGTATTTGTGGGTTTTCTGTTGCATGGCATCCAGGCTTCTGCTT
ATGTGAGAATCTACATTTGCGTACCGACTCAGCGCGGATCCTCAAAGAAAACCTGCAACAACCTACGCTGGAATTT
TCTCCATTTTGGGTGGTGTACAGAGATGCCCTGGCACTTCGATCGCTCTACTATTATGAGATCACACATGCTC
TGAGCAACTTGGGTTTTGTACACAGGAGTCATTTGAGAATCAAGACCGATATCAATGCCGTCAACGGAAACACATT
TCGACTCGACATCTTCCAGATCCAACGATTTCAATTTGTGCCTGCACCAG

NpH-e

GATCCAAAAATGCAACTCATTATCAAGAAGAAGAGCACCACCCTTTGTTTCGAAAGGAGGTTAGCCGTCTTTCTA
TTTACGAGATCCATGAGGTGGTGTACGCTTTCAGACGCATGCAGAGAGATATGTCCGCTGATGGCTTCGAATACA
TCGCTTCTTACCATGTGATCCACCTCTCTGTCCAAACCCGAAAGCTTTGCACAGATATGCATGTGCATACATG
GCATGGCTACCTTTCTGCACTGGCATCGACTATACGTGGTGCAGTTTGAGCAATCCCTTCACAGACATGGCTCCG
ATATTGGCTTTTCTTACTGGGATTGGACCCGCCCCATTACTCACATCCCGCGCTGCTTAAAGATGTCAACTACA
CTGACCCCTTTACTAACAGTGTGTAGGTAACCCGTTCAATCACGGCCATCTGTCTTTATAAGTCCAGAAGTGA
TGACCCAGAGAGATGTTTCAGGACAAGCTCTTTAAGCAGCCAAAACCTGGGACGTAACACCTGGCTGCACGACAACG
TGATCTTGGCTTTAGAGCAAACCGACTACTGTAACCTTTGAAGTACAGTTTGAGATCGTGCACAACGCCATTCATG
CCTGGGTTGGCGGAAGCCAAGAGCACTCACTCAGCCATCTCCACTTTGAGCCTATGATCCTGCCTTTTACTTGC
ACCATTCCAATGTGACCGTATCTGGGTCTCTGGCAAGAACCTCAAAGATCCGAGGCTGTGAGCTTATGAAG
CAAACCTGCGCACTGGAGTTGATGAATGAACCTCTCAAACCATTTGCTTTTCGGAAGTCCCTTACAATCTGAATGAGA
TGACCCGCAAGTACTCCCTACCAGAGGACACCTTTAACTACAAAGACCATTTTCGATTACGAATACGATATGCTGG
AATTCAGTGAATGACTATTTCCCAACTTGAAGATTACATAAAAGAAAGTCTCCATCACGAAAGAATCTTTGCAG
GGTTTCTGCTTCATGGAATTGGCCAATCAGCAAACGTTGATTTTCAGGTGTGCGACAACCAGAATCACTGTGAGG
ACGCTGGATACTTCTCCATCCTGGGAGGCTCTCTAGAAATGCCGTGGGCCTTCAACCGACTCTACCGCTATGATA
TTACGCACACCCTTGAACCTATGCACCTTAATTATGATGATAACTTCCACATTAACATTACATTCATGACATGG
CAGGGAATGACCTTGACAGCCACCTCCTGCAGAAAGCAACTATTCTCCGCCAACCGACTGCAG

NpH-f

AACATCACGAAGTGCATCATCCACTGAATCGCATCAGGCACAACATCAATGACCTCAGTGAGAGAGACATCCAGA
GTCTGAAGTCCGCTCTGATCAAAGTCAAGGAAGATCACAGCAACTTTGGGTTCCAGACTATCACTTCTATCATG
GTTTGCCTGCCTCGTGTCCCCTCCTGAGGAGGCCACTTATGCTTGTCTGTATGCACGGCATGGCTGCCTTCCCAC
ACTGGCATCGTCTGTATGCTCTGCAGTTTGAAGAATCCCTACTCCGTCATGGCTCTAGCGTGGCTCTGCCTTACT
GGGATTGGACCCACAAAATAACTGGACTTCCCCTCTGCTCAGCAACCCAGATTACTATGATGCTCTGCATAAGC
AGGTCACTGAAAACCCATTTTTAAGAGGACACATTGAAGTGGCAGAAACATATACAGTAAGAAAACCCCAACCAG
AACTTTTCGAACCGAGTAAAGATGGAAAGCATTCCCTTTTTGTACGATGAAATACTTCTGGCATTAGAGCAAAGAG
ACTACTGTGACTTTGAGGTGCAGTTTGAAGTTGTCCATAATGCTATCCATTATTTGGTGGGTGGTCACCAACGAT
ATTCAATGTCCAGTCTAGAATATGCTTCCCTACGACCCTCTTTTCTTCAATACCATTCCAATGTGGACCGACTGT
GGGCCATTTGGCAAGCATTACAACAATACAGAAGGATTCTTACAACAAAAGCTTACTGCGCTTGGAAACAGATGA
CACACGCAATGAAGCCATTTGATCGAGAAAACAAATCCAAACAAAAACACACATGATCACGCCATTTCCAACTCAG
TTTTTAATTATGATGATCTGGGATACAGTTACGATAACCTGCTGTTTGTATGGCCTAACTATCACTGAACTAGAAG
AAAAGATCCACAGCAGACAGAGTCACCCACGTGTGTTTGGCGGATTCCTTTTACATGCAATTTGGAACCTCTGCTG
ATGTGCATGTCTCTGTGTGTACCATGGAACAACCTGCACAAGTGGCGCCTATTCTTTATCCTAGGTGGAAAAC
ACGAGATGCCCTGGAAGTATGACCGTCTGTTTGGTATGACATCACTGATGCTGTCACTAAGGCTGGCTTTAGTC
CAGAGGATGTCTTCAATGACAATTTGCTCTACAAGATTACACAGAAATCAATGCTGTAATGGAAGTCACATTTG
ACTCCCATATCATGCACGAGCCACCTTAATATTTGTTCCAGGAAGAG

NpH-g

ATACCAAACAAGCAGAAAAGAGAAAAGACGAATTTCTGGAGGACCAATAATCCGAAAAAATATCAACAAACTGACTT
CGTCTGAAATCCATGAACTGAGAGAGGCAATGGCAGCAGTACAAGCTGACCATTCTTCAAATGGCTACCAGGCCA
TTGCTGCCTACCATGGCTTGCCCTCTGCAGTGTAAGCCATATGCCTGTTGCCAACATGGCATGCCCACTTTCCAC
ACTGGCATCGACTTTATGTGAAACAGATGGAAGATACTCTGCACACACATGGCTCTCACTTGGGGATACCATACT
GGGACTGGACTGAGGCCTTTGAATACCTGCCCATCCTGGTCACTGAAACAGAACATAATCCATTCCATCACGCAA
AAATTGAATTCATCAACGAGACCACATCACGAAATCCTCGACCCCAACTCTTTACCGACCAAAGGTACGGAGAAA
CATCGTTCTTCTACCGGCAGATATTGCTGGCTCTGGAGCAGACTGACTTCTGTGATTTTCGAGATACAGTTTCAAG
TGGGCCACAACGCCATCCACTCATGGGTGGGAGGCTCGACTCAGTATGGAATGTCAACACTCCACTTCACGAGTT
ACGATCCCTTGTTCTACATTCACTCGAACACAGACAGGATCTGGGCAATCTGGCAGGCCCTGCAGCGTTACC
GAGGTCTTCCCTACAACAGCGCAAACCTGCGAGATCCATCTTTTGAAGAAACCCTAGAACCAATTCAGCTTCGAGA
GCAACCCCAACCATGAGACCCACAATCATTCCACCGGTAACGCCGTCTTTCGACTACCACCAGTTGGGCTACGAGT
ACGACACGCTAGAGTTCCACGGTCACAACATTTCCCAGCTGGCTGTCTACCTTGACTCCTACCACGAAACATGACA
GGGTCTTCGCTGGCTTCTGCTTACGGAATCAAACGATCTGCTGACGTCAACTTCGACATCTGCAGCTTGAATG
GAGATTGCACCAATGCTGGCACATTTGCTTTACTGGGTGGAGAACACGAAATGCCCTGGGCCTTTGACCGTCTTT
TCAAGTACGACATCACCAAACCTTTGCAGAATCTGCGCCTGCATTCTACCGACGACTTTAGTATTAATATCCACA
TTGTGGCTATCAACGGCGAGGAACTCGACAGCCATCTCATTCCAACACCCTCTATTATCTTCTCACCTGGAAGAG
GAGCCCAGCAC

3' UTR

TAGAAGTTTTTTTTTCTGAGTTTACAAGATCGAAGACAACACAAGACACTAGGATCGGATAAAGCTAACCAAGAGA
AATTATCTATTTTACACCATGTTTTACAGATGGTTTCATTAGTAAACTGCATAAAGATGAGATTGCTAAATCATCA
CAAGGTAATGTTAATTATATTCTGAAGTTATAACAAATGCTGACCATCTTTATCGCCGGCTATGAATGTTGGGCA
TCATGGCATCAAGAACTTATGAAGATAGCCTTATCAGCCAATGAGAAAGGGATCTGCAAGCATCTCCAGATGACC
TTCGGGGCTTTTTTTTTTGTAAAAGTCTGTTCAATAAACATTTAATGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

NpH-a*

CCACCAATATTCGTAAAAATGTGGACATTTTGACCTCTGAGGAGACAGTGAATTTGCAAAAAGCTCTGAGGGAAA
TTCAAGATGATCACTCTTCAAATGGTTACCAGGCTATTGCAGGCTACCACGGAGAACCCTGCGGCATGTTTCAGACA
GTCTCGGACATCCGGTGGTGTGCTGTCTCCATGGCATGCCACATTTCCCCAGTGGCACAGGCTGTATGTCACTC
AGATGGAGCAGAGTTTGATCAGTCACGGCGCCACTCTCGGCTTCCATACTGGGACTGG

NpH-f*

TGGGCCATTTGGCAAGCATTACAACAACACAGAAGGCTGCCTTACAACAGAGCTTACTGCGCCTTGGAGCAGATG
TCGCACGCAATGAAGCCATTTGATCGAGAAAACAAATCCAAACAAAAACACACGTGATCACGCAATAGCCAACTCA
GTTTTTGGAGTACGATGATCTGGGATACAGTTACGATAACCTGCTGTTTGTATGGCCTAACTGTGCTGAACTAGAA
CAAGAGATCCGCAACAGGCAGAGTCACCCACGTGATTTGCCGGATTCCCTTTTACACGCAATTGGAACCTCTGCT
GACGTGCACGTCTCTGTGTGTACCATGAAAGCAACTGCACGAACGCCGGCCTATTCTTTATCTTAGGAGGACAA
CACGAGATGCCCTGGGAGTATGACCGCCTGTTCAAGTATGACATCACTGACGCCATCGTCCAGGCTGGCTTCACT
CCAGAGGCCGATTTGATGACAAAATGCCCTTCAAGATTATATGAAGATCAGCGCTGTAAACGGAAAGTCACATC
GACTCTCGTATCATCCACGAGCCCACCTTAATATTTGTGCCAGGAAGAG

Nautilus macromphalus**NmH-b**

CCCATGCGCCAGATTGACAGAGAAAAATTGGTAGTGAGGAAAGATTTACGCCGTCTTCACGACACAGAAGAGTTT
GGTCTGAGGCAAGCGATGGCGCGCTTTATGAAAGACGAGTCTATCGATGGCTTCCAGGCTCTGGTTGAGTACCAC
GGTCTGCCTGCCCCTGTCTGACTCCAGAGGGTAATCGCATTGCTTGGCTGCATTTCATGGCATGGCTACTTTTCCA
CACTGGCACCCGGCTGTTTGTACTGCAGGTAGAGGATGCTCTTATTGCGCGAGGATCACCCATCGGAATTCCTTAT
TGGGACTGGGCCCCCAATGAACAGTCTGCCGCATCTTATTGCCGATGAGACCTATATCAATCCATACAGCAAC
AAAAGTGTTCCTAATCCGTTTACCATGGTTCCATAGATTTTCTGCATGACCATATCACGACGCAGAGAGATATC
AAGCGGGAGACGCTGTTTGTAGCAACCTGAGTTTGGCGACCACACATATCTCTTTGACGGAAGGGC

NmH-d

GCGCCAGTCAATCAGGAAAGATTTGAACACGTTGACTGACGGAGAAGTGGAGAGCTTGAGAAATGCTTTCTTTC
GTCTGCAGGAAGAAGGTGCCTATGAGCCAATTGCTGCTTTCCATGGCGTTCAGCAAAGTGTAGAGGTGAAGATG
GCAACATTTACACGTGCTGCGTGCACGGCATGCCAACATTCCTCACTGGCACAGACTGTACGTTATCCAGGTAG
AACATGCTCTGCGGGAACGAGGCTCTGGAGTGTCTGTGCCCTACTGGGACTGGACCAAACGTTTTAACCACCTAC
CGGAATTGATAGACGAATCCACATTCTACAACCTCTCGGAAAAACGAAATGAACACCAACCCTTTCCATAGGGGCT
CAATCTCCTTCATTAATTCGCACACAAGCAGAGACTTTTCAGCCAGAAGTGTCAACAGTGACTACTTATATGAAA
ACACTCTACTGGCATTAGAGCAGAATGATTTCTGCAACTTCGAGGTCCAGTTAGAGGTCTTGACAATGCAATTC
ATGCCTGGATTGGTGGACGAGACACATATTCTATGTCTTCTCTTACTATGCTGCCTATGATCCAATCTTTTTCA
TTCACCATTCTACCCTTGACAGAATATGGGCAATTTGGCAAGAGTTGCAACGTTATCGAGGTCTGCCTTACAACG
AGGCTAACTGCGCTCTTCCACTAATGAATCAGCATCTACGACCATTTAACAATGTCTCTGTTAACCACGACCGCA
ACACCTTAACCTTGAACAGGCCTAATGATGCCTTTGATTACCAGAACCATTTCCACTACCGCTATGACAACCTGG
ACTTTCATGGTCTTTCTATCCCTCAGTTAGAGCACGAATTACACGAGAGGCAGACTCACGATCGGGTATTCGTGG
GTTTCCTGTTGCATGGCATCCAGGCTTCTGCTAATGTGAGAATCTACATTTGCGTACCGACTCAGCGCGGATCCT
CAAAAGAAAACCTGCAACAACCTACGCTGGAATTTTCTCCATTTTGGGTGGTGTACAGAGATGCCCTGGCACTTCG
ATCGCCTCTACTATTATGAGATCACACATGCTTTGAGCAACTTGGGTTTGTACACAGGAGTCATTTCAGAATCA
AGACCGATATCAATGCCGTCAACGGAACACATTTGACTCGCACTTC

9. Internetadressen

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

Da Internetadressen standen zum Zeitpunkt der Arbeit zur Verfügung.

G Literatur

- Adamkevicz, S.L., Harasewych, M.G., Blake, J., Saudek, D., Bult, C.J., 1997. A molecular phylogeny of the Bivalve mollusks. *Mol. Biol. Evol.* 14, 619-629.
- 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.
- 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.
- Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1997. Phylogenetic analysis of Lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14, 569-577.
- Bause, E., 1983. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J.* 209, 331-336.
- 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. pp. 125-270, Chapman & Hall, London.
- 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 Res.* 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.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkali extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Boisset, N., Mouche, F., 2000. *Sepia officinalis* hemocyanin: A refined 3D structure from field emission gun cryoelectron microscopy. *J. Mol. Biol.* 296, 459-472.
- Boletzky von, S., 1992. Evolutionary aspects of development, life style, and reproductive mode in incirrate octopods (Mollusca, Cephalopoda). *Rev. Suisse Zool.* 99, 755-770.
- 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., Boucher-Rodini, R., Monnerot, M., 1997. Phylogeny of cephalopods inferred from mitochondrial DNA Sequences. *Mol. Phy. Evol.* 7, 44-54.
- 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.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 1990. Invertebrates. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Burmester, T., 2001. Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Mol Biol Evol.* 18, 184-195.
- Campbell, D.C., Hoekstra, K.J., Carter, J.G., 1998. 18S ribosomal DNA and evolutionary relationships within the Bivalvia. In: Johnston, P.A., Haggart, J.W. (Eds.). *Bivalves: An Eon of Evolution – Palaeobiological studies honouring Norman D Newell*. University of Calgary Press, Calgary, pp. 1-45.

- Carlini, D.B., Young, R.E., Vecchione, M., 2001. A Molecular Phylogeny of the Octopoda (Mollusca: Cephalopoda) evaluated in light of morphological evidence. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21, 388-397.
- Chabicovsky, 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.
- Cope, J.C.W., 2000. A new look at early bivalve phylogeny. In: Harper EM, Taylor JD & Crame JA (Eds). *Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Special Publication of the Geological Society, London, 177, 81-95.
- Cope, J.C.W., 1997. The early phylogeny of the Class Bivalvia, *Palaeontology* 40(3), 713-746.
- 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.
- 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
- Decker, H., Terwilliger, N., 2000. Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J. Exp. Biol.* 12, 1777-1782.
- Declercq, L., Witters, R., Preaux, G., 1990. Partial sequence determination of *Sepia officinalis* hemocyanin via cDNA. In: Preaux, G., Lontie, R. (Eds.). *Invertebrate Dioxygen Carriers*. Leuven University Press, Louvain, Belgium, 131-134.
- 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.
- Erixon, P., Sennblad, B., Britton, T., Oxelman, B., 2003. Reliability of Bayesian Posterior Probabilities and Bootstrap Frequencies in Phylogenetics. *Syst. Biol.* 52, 665-673.
- Fedonkin, M.A., Waggoner, B.M., 1997. The Late Precambrian fossil *Kimberella* is a mollusc-like bilaterian organism. *Nature* 388, 868-871.
- 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.
- Fernandez-Patron, C., Calero, M., Collazo, P.R., Garcia, J.R., Madrazo, J., Mussacchio, A., Soriano, F., Estrada, R., Frank, R., Castellanos-Serra, L.R., Mendez, E., 1995. Protein reverse staining: high-efficiency microanalysis of unmodified proteins detected on electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* 224, 203-211.
- Foote, M., Sepkoski, J.J.Jr., 1999. Absolute measures of the completeness of the fossil record. *Nature* 398, 415-417.

- Frýda, J., Blodgett, R.B., 2001. The oldest known heterobranch gastropod, *Kuskokwimia* gen. nov., from the Early Devonian of west-central Alaska, with notes on the early phylogeny of higher gastropods. *Vestník Českého geologického ústavu* 76, 39-53.
- Frýda, J., 2001. Discovery of a larval shell in Middle Paleozoic subulitoidean gastropods with description of two new species from the Early Devonian of Bohemia. *Bulletin of the Czech Geological Survey* 76, 29-37.
- 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 thomasi*. *Arch. Biochem. Biophys.* 372, 128-134.
- 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., Vanhoegaerden, R., Myulle, K., Preaux, G., 1990. Microheterogeneity of functional unit d of the β_c -hemocyanin of *Helix pomatia*. In: Preaux, G., Lontie, R. (Eds.). *Invertebrate Dioxygen Carriers*. Leuven University Press, Leuven, 147-152.
- Gielens, C., De Geest, N., Xin, X.Q., Devreese, B., Van Beeumen, J., Preaux, G., 1997. Evidence for a cysteine-histidine thioether bridge in functional units of molluscan haemocyanins and location of the disulfide bridges in functional units d and g of the β_c -haemocyanin of *Helix pomatia*. *Eur. J. Biochem.* 248, 879-888.
- 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., Wheeler, W., 2002. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invert. Biol.* 121, 271-324.
- Götting, K.J., 1980a. Origin and relationships of the Mollusca. *Z. Zool. Syst. Evol. Forsch.* 18, 24-27.
- Götting, K.J., 1980b. Argumente für die Deszendenz der Mollusken von metameren Antezedenten. *Zool. Jb. Anat.* 130, 211-218.
- 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., 1986. Development of the pericalymma larva of *Solemya reidi* Bernard 1980. (Bivalvia, Cryptodonta, Solemyidae) as revealed by light and electron microscopy. *Mar. Biol.* 93, 411-427.
- 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.
- Hall, R.L., Wood, E.J., Kamberling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, F.G., 1977. 3-O-methyl sugars as constituents of glycoproteins. Identification of 3-O-methylgalactose and 3-O-methylmannose in pulmonate gastropod haemocyanins. *Biochem J.* 165, 173-176.

- 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., 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.
- Hazprunar, G., 1996. The molluscan rhogocyte (pore cell, Blasen-zelle, cellule nucale), and its significance for ideas on nephridial evolution. *J. Mol. Stud.* 62, 185-211.
- Hennig, W., 1979. *Taschenbuch der Speziellen Zoologie*. Teil 1, Wirbellose I. Verlag Harri Deutsch, Zürich, pp. 392.
- Herskovits, T.T., Hamilton, M.G., Cousins, C.J., Wall, J.S., 1990. Light-scattering and scanning transmission electron microscopic investigation of the hemocyanin of the bivalve, *Yoldia limatula* (Say). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 96, 497-503.
- Herskovits, T.T., Cousins, C.J., Hamilton, M.G., 1991. The stabilizing influence of divalent ions and Na⁺ on the di-decameric structure of *Yoldia limatula* hemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 1076, 71-78.
- 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.
- 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. In: Taylor, J.D. (Ed.). *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. Oxford Science Publications, London, 59-65.
- Jeletzky, J.A., 1966. Comparative morphology, phylogeny, and classification of fossil coleoidea. The University of Kansas paleontological contributions. *Mollusca* 7, 1-162.
- 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.

- Keen, A.M., 1969. Family Nucleidae Gray 1824. In: Moore, R.C., Teichert, C. (Eds.). Treatise on Invertebrate Paleontology. Part N. Mollusca 6. Vol.1. Bivalvia. Geological Society of America & University of Kansas Press, Boulder, Colorado & Lawrence, Kansas, pp. N230-N231.
- 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. *Eur. J. Biochem.* 264, 27-38.
- Kenchington, E.L., Roddick, D.L., Singh, R.K., Bird, C.J., 1994. Analysis of the small-subunit rRNA gene sequences from six families of molluscs. *J. Mar. Biotechnol.* 1, 215-217.
- Khyse-Andersen, J., 1984. Electroblothing of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209.
- 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.
- Kroll, J., 1973. Crossed-line immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.* 2, 79-81.
- Kurokawa, T., Wuhler, 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.
- 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.
- Lambert, O., Boisset, N., Penczek, P., Lamy, J., Taveau, J.C., Frank, J., Lamy, J.N., 1994. Quaternary structure of *Octopus vulgaris* hemocyanin. Three-dimensional reconstruction from frozen-hydrated specimens and intramolecular location of functional units Ove and Ovb. *J. Mol. Biol.* 238, 75-87.
- Lambert, O., Boisset, N., Taveau, J.C., Lamy, J.N., 1995a. Three-dimensional reconstruction of *Sepia officinalis* hemocyanin from frozen-hydrated specimens. *Arch. Biochim. Biophys.* 316, 950-959.
- Lambert, O., Taveau, J.C., Boisset, N., Lamy, J.N., 1995b. Three-dimensional reconstruction of the hemocyanin of the protobranch bivalve mollusc *Nucula hanleyi* from frozen-hydrated specimens. *Arch. Biochem. Biophys.* 319, 231-243.
- 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.
- Lamy, J., You, V., Taveau, J.C., Boisset, N., Lamy, J.N., 1998. Intramolecular localization of the functional units of *Sepia officinalis* hemocyanin by immunoelectron microscopy. *J. Mol. Biol.* 284, 1051-1074.
- Langley, K.E., Villarejo, M.R., Fowler, A.V., Zamenhof, P.J., Zabin, I., 1975. Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72(4), 1254-1257.
- 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.
- Lee, M.S.Y., 1999. Molecular clock calibrations and Metazoan Divergence Dates. *J. Mol. Evol.* 49, 385-391.
- 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., Boisguerin, 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.
- 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.
- Lommerse, J.P., Thomas-Oates, J.E., Gielens, C., Preaux, G., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F., 1997. Primary structure of 21 novel monoantennary and diantennary N-linked carbohydrate chains from alpha-D-hemocyanin of *Helix pomatia*. *Eur. J. Biochem.* 249, 195-222.
- Loncke, P., Vanderzande, M., Gielens, C., Preaux, G., 1990. Identification of the missing functional unit in *Octopus vulgaris* hemocyanin from a comparison with *Sepia officinalis* hemocyanin. In: Preaux, G., Lontie, R., (Eds.). *Invertebrate Dioxygen Carriers*. Leuven University Press, Leuven, 295-298.
- Lydeard, C., Holznagel, W.E., Schnare, M.N., Gutell, R.R., 2000. Phylogenetic analysis of molluscan mitochondrial LSU rDNA sequences and secondary structures. *Mol. Phylogenet. Evol.* 15, 83-102.
- Mangum, C.P., Miller, K.I., Scott, J.L., van Holde, K.E., Morse, M.P., 1987. Bivalve hemocyanin: structural, functional and phylogenetic relationships. *Biol. Bull.* 173, 205-221.
- 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., Süling, 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., 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.
- Martin, M.W., Grazhdankin, D.V., Bowring, S.A., Evans, D.A.D., Fedonkin, M.A., Kirschvink, J.L., 2000. Age of Neoproterozoic Bilaterian Body and Trace Fossils, White Sea, Russia: Implications for Metazoan Evolution. *Science* 288, 841-845.
- Meissner, U., Dube, P., Harris, J.R., Stark, H., Markl, J., 2000. Structure of a molluscan hemocyanin dodecamer (HtH1 from *Haliotis tuberculata*) at 12 Å resolution by cryoelectron microscopy. *J. Mol. Biol.* 298, 21-34.

- 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.
- Miller, K.I., van Holde, K.E., 2003. XIIIth Conference on Dioxygen Binding Proteins, Mainz Germany.
- Morse, M.P., Meyhofer, E., Otto, J.J., Kuzirian, A.M., 1986. Hemocyanin respiratory pigment in bivalve mollusks. *Science* 231, 1302-1304.
- Morton, B.S., 1996. The evolutionary history of the Bivalvia. In: Taylor, J.D. (Ed.). *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca.*, Oxford University Press, Oxford, pp. 337-359.
- Mouche, F., Boisset, N., Lamy, J., Zal, F., Lamy, J.N., 1999. Structural comparison of cephalopod hemocyanins: Phylogenetic significance. *J. Struct. Biol.* 127, 199-212.
- Nicholas, K.B., Nicholas H.B.Jr., 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>.
- 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.
- Perbandt, 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.
- Perler, F., Efstratiadis, A., Lomedico, P., Gilbert, W., Kolodner, R., Dodgson, J., 1980. The evolution of genes – the chicken preproinsulin gene. *Cell* 20(2), 555-556.
- 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.
- Philippe, H., Chenuil, A., Adoutte, A., 1994. Can the Cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny? *Development* NR, 15-25.
- Pojeta Jr., J., 1980. Molluscan phylogeny. *Tul. Stud. Geol. Paleontol.* 16, 55-80.
- Purchon, R.D., 1956. The stomach in the Protobranchia and Septibranchia (Lamellibranchia). *Proc. Zool. Soc. London* 127, 511-525.
- Rogozin, I.B., Lyons-Weiler, J., Koonin, E.V., 2000. Intron sliding in conserved gene Families. *Trends Genet.* 16(10), 430-432.
- Roy, S.W., 2003. Recent evidence for the Exon Theory of Genes. *Genetica* 118, 251-266.
- Runnegar, B., Pojeta Jr., J., 1974. Molluscan phylogeny: the paleontological viewpoint. *Science* 186, 311-317.
- Ruth, P., Schipp, R., Klussendorf, B., 1988. Cytomorphology and copper content of the basal cells in the midgut-gland of *Nautilus* (Cephalopoda, 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., Beltrami, M., Alzuet, G., Casella, L., 1998. The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: o-diphenol oxidase activity. *Biochemistry* 37, 14065-14077.
- Sander, C., Schneider, R., 1991. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 9, 56-68.
- Saunders, W.B., 1987. The species of *Nautilus*. In: Saunders, W.B., Landman, N.H. (Eds.). *Nautilus, The Biology and Paleobiology of a living fossil*. Plenum Press, New York and London, pp. 35-64.
- Scheltema, A.H., 1993. Aplacophora as progenetic Aculiferans and the coelomate origin of the molluscs as the sister taxon of Sipuncula. *Biol. Bull.* 184, 57-78.
- Scheltema, A.H., 1996. Phylogenetic position of Sipuncula, Mollusca and the progenetic Aplacophora. In: Taylor, J.D. (Ed.). *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. Oxford Science Publications, London, pp. 53-58.
- Schilthuizen, M., Gittenberger, E., Gulyaev, A.P., 1995. Phylogenetic relationships inferred from the sequence and secondary structure of ITS1 rRNA in Albinaria and putative Isabellaria species (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 4, 457-462.
- 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.
- Siezen, R.J., van Bruggen, E.F., 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Stead, R.A., Thompson, R.J., 2003. Physiological energetics of the protobranch bivalve *Yoldia hyperborean* in a cold ocean environment. *Polar Biol.* 26, 71-78.
- Steiner, G., 1992. Phylogeny and classification of Scaphopoda. *J. Mol. Stud.* 58, 385-400.
- Steiner, G., Muller, M., 1996. What can 18S rDNA do for bivalve phylogeny? *J. Mol. Evol.* 43, 58-70.
- Steiner, G., Dreyer, H., 2003. Molecular phylogeny of Scaphopoda (Mollusca) inferred from 18S rDNA sequences: support for a Scaphopoda-Cephalopoda clade. *Zoologica Scripta* 32, 343-356.
- Stoeva, S., Idakieva, K., Rachev, R., Voelter, W., Genov, N., 1997. Amino-terminal oxygen-binding functional unit of the *Rapana thomasiana* grosse (gastropod) hemocyanin: carbohydrate content, monosaccharide composition and amino acid sequence studies. *Comp. Biochem. Physiol. B* 117, 101-107.
- Stoeva, S., Idakieva, K., Genov, N., Voelter, W., 1997. Complete amino acid sequence of dioxygen-binding functional unit of the *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 403-410.

- 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). *Biochim. Biophys. Acta* 1435, 94-109.
- Stoeva, S., Idakieva, K., Betzel, C., Genov, N., Voelter, W., 2002. Amino acid sequence and glycosylation of functional unit R₂H₂-e from *Rapana thomasiana* (gastropod) hemocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.* 399, 149-158.
- 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 Biochem. Mol. Biol.* 89, 189-195.
- Terwilliger, N.B., 1998. Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *J. Exp. Biol.* 201, 1085-1098.
- 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.
- 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.
- Vanderzande, M., Gielens, C., Preaux, 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: Preaux, G., Lontie, R. (Eds.). *Invertebrate Dioxigen 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., Decker, H., 2001. Hemocyanins and invertebrate evolution. *J. Biol. Chem.* 276, 15563-15566.
- van Kuik, J.A., van Halbeek, H., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., 1985. Primary structure of the low-molecular-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.

- van Kuik, J.A., Sijbesma, R.P., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Wood, E.J., 1986. Primary structure of a low-molecular-mass Nlinked oligosaccharide from hemocyanin of *Lymnaea stagnalis*. 3-O-methyl-D-mannose as a constituent of the xylose-containing core structure in an animal glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* 160, 621-625.
- von Boletzky, S., 1992. Evolutionary aspects of development, life style, and reproductive mode in incirrate octopods (Mollusca, Cephalopoda). *Rev. Suisse Zool.* 99, 755-770.
- von Salvini-Plawen, L., 1990a. Origin, phylogeny and classification of the phylum Mollusca. *Iberus* 9, 1-33.
- von Salvini -Plawen, L., 1990b. The status of the Caudafoveata and the Solenogastres in the Mediterranean Sea. *Lavori S:I:M.* 23, 5-30.
- von 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, pp. 29-53
- Waller, T.R., 1998. Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups. In: Johnston, P.A., Haggart, J.W. (Eds.). Bivalves: An Eon of Evolution – Palaeobiological studies honouring Norman D Newell. University of Calgary Press, Calgary, pp. 1-45.
- 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. B* 266, 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.
- Weeke, B., 1973. Crossed immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.* 2, 47-56.
- 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.
- Wilding, C.S., Mill, P.J., Grahame, J., 1999. Partial sequence of the mitochondrial genome of *Littorina saxatilis*: relevance to gastropod phylogenetics. *J. Mol. Evol.* 48, 348-359.
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T., De Wachter, R., 1994. Small ribosomal subunit RNA and the phylogeny of Mollusca. *Nautilus* 2, 98-110.
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T., De Wachter, R., 1996. Investigation of molluscan phylogeny on the basis of 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1306-1317.
- 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.
- Wray, C.G., Landmann, N.H., Saunders, W.B., Bonacum, J., 1995. Genetic divergence and geographic diversification in *Nautilus*. *Paleobiology* 21, 220-228.
- 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.
- Young, R.E., Secchione, M., 1996. Analysis of morphology to determine primary sister taxon relationships within coleoid cephalopods. *Amer. Malac. Bull.* 12, 91-112.