

**Zur Evolution des Cytoskeletts  
beim Sibirischen Stör *Acipenser baeri***

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Mark Haberkamp  
geb. in Frankfurt/M.

Mainz, November 2002

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2002

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jürgen Markl danke ich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für seine fachkundige Betreuung der wissenschaftlichen Arbeit.

Ein besonderes „Danke schön“ geht an Dr. Michael Schaffeld, der anscheinend nicht nur jedes IF-Paper kennt, sondern einem auch mit Rat und Tat zur Seite steht.

Für die wirklich zahlreichen Hilfen und Tips in allen molekularbiologischen Fragen danke ich Dr. Bernd Lieb - keine Angst, ich frag' jetzt nichts mehr -.

Für die große Unterstützung bei der biochemischen Arbeit danke ich Thomas Schubert.

Vielen Dank an Nicole Tappe, die während ihrer Diplomarbeit einen wahren Berg an Bildern und Daten zu meistern hatte.

Dank auch an Dr. Ulrich Meißner und die anderen „Admins“, die dafür sorgten, daß wir in der täglichen „Dateiflut“ unsere Daten wiederfinden konnten.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für eine tolle Arbeitsatmosphäre. Das „Drumherum“ war nicht selbstverständlich und ich werde die gemeinsame Zeit im Labor bestimmt vermissen, vor allem die Laborbesprechungen....

Einen großen Dank natürlich auch an meine Eltern, die es mir mit Ihrer Unterstützung und Ihrem Vertrauen ermöglicht haben meinen Weg so weiterzugehen wie ich es wollte.

Nicht zuletzt möchte ich natürlich meiner Freundin Azra danken. Ohne Deine Unterstützung und Dein Verständnis wäre die Arbeit - wieder einmal - bedeutend schwieriger gewesen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.	<b>Das Cytoskelett der tierischen Zelle</b>	<b>1</b>
2.	<b>Struktur und Klassifizierung der IF-Proteine</b>	<b>2</b>
2.1	Die Typ I und II IF-Proteine: Keratine	5
2.2	Die Typ III-Proteine Desmin und Vimentin	6
2.3	Die Typ V-Proteine: Lamine	7
3.	<b>Die Evolution der Intermediärfilamentproteine</b>	<b>9</b>
4.	<b>Das IF-Proteinsystem bei Fischen und Ziel der Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>B</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
1.	<b>Chemikalien und Geräte</b>	<b>12</b>
2.	<b>Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen</b>	<b>12</b>
3.	<b>Das Forschungsobjekt</b>	<b>12</b>
3.1	Systematische Einordnung des Sibirischen Störs ( <i>Acipenser baeri</i> )	13
3.2	Gewebepräparation	14
4.	<b>Verwendete Antikörper</b>	<b>15</b>
4.1	Antikörper gegen Keratine	15
4.2	Antikörper gegen Desmin und Vimentin	16
4.3	Antikörper gegen Neurofilamentproteine	16
5.	<b>Biochemische Präparation der Intermediärfilamente (Cytoskelett-Präparation)</b>	<b>16</b>
5.1	Extraktionslösungen	16
5.2	Extraktion der Intermediärfilamente aus Gewebe	17
6.	<b>Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE)</b>	<b>18</b>
6.1	Gellösungen	18
6.2	Präparation der Gele und der Elektrophoresekammer	19
6.3	Vorbereitung der Proben	19
6.4	Elektrophorese	20
7.	<b>Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)</b>	<b>20</b>
7.1	Die erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung; IEF)	21
7.1.1	Gellösungen	21
7.1.2	Präparation der Rundgele	22
7.1.3	Vorbereitung der Proben und der Elektrophoresekammer	23
7.1.4	Elektrophorese und Weiterbehandlung der Rundgele	23

---

7.2	Die zweite Dimension (SDS-PAGE)	24
7.3	Färben der Proteine im Gel	24
<b>8.</b>	<b>Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen</b>	<b>25</b>
8.1	Das Naßblotverfahren	25
8.2	Reversible Färbung der Proteine mit Ponceau S	26
<b>9.</b>	<b>Identifizierung von Typ I und Typ II Keratinen</b>	<b>26</b>
9.1	Biotinylierung von Proteinen	26
9.2	Komplementärer Keratin-Blot-Bindungs-Test (CKBB-Test)	27
9.2.1	Lösungen	27
9.2.2	Inkubation der Membranen	27
9.3	Biotin/Streptavidin-Nachweis von Proteinen	27
<b>10.</b>	<b>Immunoblot</b>	<b>28</b>
10.1	Lösungen	28
10.2	Inkubation mit dem primären Antikörper	28
10.3	Inkubation mit dem sekundären Antikörper	28
<b>11.</b>	<b>Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase</b>	<b>29</b>
11.1	Lösungen	29
11.2	Farbreaktion	29
<b>12.</b>	<b>Foto-Dokumentation</b>	<b>29</b>
<b>13.</b>	<b>Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie</b>	<b>30</b>
13.1	Anfertigung und Fixierung von Gewebeschnitten	30
13.2	Antikörperinkubation und Einbetten der Gewebeschnitte	30
13.2.1	Herstellung des Einbettmediums	30
13.2.2	Inkubation mit dem primären Antikörper	31
13.2.3	Inkubation mit dem sekundären Antikörper	31
13.3	Mikroskopieren und Fotografieren	31
<b>14.</b>	<b>Allgemeine molekularbiologische Methoden</b>	<b>32</b>
14.1	Medien und Agarplatten	32
14.2	Bakterienstämme, Phagen und Vektoren	33
14.3	Bakterienkulturen	33
<b>15.</b>	<b>Nucleinsäure-Präparationen</b>	<b>35</b>
15.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe	35
15.2	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nucleinsäuren	36
15.3	Fällung und Reinigung von Nucleinsäuren	36
15.4	mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA	37
15.5	Elektrophoretische Auftrennung von RNA im Agarosegel	37
15.5.1	Lösungen	37
15.5.2	Vorbereiten der Proben	38

---

15.5.3	Herstellen des Geles und Elektrophorese	38
15.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	39
15.6.1	PCRs mit RNA	39
<b>16.</b>	<b>Herstellung einer cDNA-Expressionsbibliothek</b>	<b>40</b>
16.1	Erststrangsynthese	40
16.2	Zweitstrangsynthese	41
16.3	Auffüllen der cDNA-Enden („Blunting“)	41
16.4	Ligation der <i>EcoR</i> I-Adapter	42
16.5	Phosphorylierung der <i>EcoR</i> I Enden	42
16.6	Verdau mit <i>Xho</i> I	43
16.7	Größenfraktionierung der cDNA über Sephacryl-S-500	43
16.7.1	Größenfraktionierung	43
16.7.2	Reinigung der Fraktionen	43
16.8	Ligation der cDNA in die Vektorarme	44
16.9	Verpackung der cDNA	44
16.10	Titerbestimmung der Primärbank	45
16.11	Amplifikation der Primärbank	45
<b>17.</b>	<b>Durchsuchen der cDNA-Bibliothek („Screening“)</b>	<b>46</b>
17.1	Screening mit Antikörpern	46
17.1.1	Lösungen	46
17.1.2	Das Verfahren	47
17.2	Screening mit DNA-Sonden	47
17.2.1	Lösungen	47
17.2.2	Digoxigenin-Markierung von DNA	48
17.2.3	Das Verfahren	49
<b>18.</b>	<b><i>In vivo</i>-excision</b>	<b>50</b>
<b>19.</b>	<b>Plasmid-Präparation</b>	<b>51</b>
<b>20.</b>	<b>Restriktionsverdau</b>	<b>51</b>
<b>21.</b>	<b>Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarose-Gel</b>	<b>52</b>
21.1	Lösungen	52
21.2	Vorbereitung des Geles und die Elektrophorese	52
<b>22.</b>	<b>Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen</b>	<b>52</b>
<b>23.</b>	<b>DNA-Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen</b>	<b>53</b>
23.1	Molekulare Phylogenie	54
<b>24.</b>	<b>MALDI-Massenspektrometrie</b>	<b>55</b>

<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
1.	<b>Allgemeines und Vorgehensweise</b>	<b>56</b>
2.	<b>Gewebetypische Expression der IF-Proteine vom Typ I-III</b>	<b>58</b>
3.	<b>Biochemische Identifizierung der IF-Proteine vom Typ I-III</b>	<b>60</b>
3.1	Biochemische Identifizierung der „E“- und „S“-Keratine	60
3.2	Biochemische Identifikation von Desmin und Vimentin	62
4.	<b>Sequenzierung von Keratinen</b>	<b>64</b>
4.1	Für Typ I-Keratine codierende cDNA-Klone ( <i>abak10</i> bis <i>abak15</i> , <i>abak18</i> )	64
4.2	Für Typ II-Keratine codierende cDNA Klone ( <i>AbaK1</i> , <i>AbaK2</i> und <i>AbaK8a</i> )	68
5.	<b>Sequenzierung von Desmin und Vimentin</b>	<b>71</b>
6.	<b>Ein Typ V-IF-Protein, Lamin B</b>	<b>72</b>
7.	<b>Zuordnung der sequenzierten IF-Proteine durch MALDI-MS</b>	<b>74</b>
8.	<b>Katalog der sequenzierten IF-Proteine</b>	<b>78</b>
<b>D</b>	<b>Diskussion</b>	<b>80</b>
1.	<b>Die IF-Proteine des Störs <i>Acipenser baeri</i></b>	<b>80</b>
1.1	Werden Keratine beim Stör auch mesenchymal exprimiert?	80
1.2	Identifikation der verschiedenen IF-Proteintypen	81
1.3	Die Ergebnisse der MALD-MS-Analysen	82
1.4	Schwierige Zuordnung einiger Keratine	83
1.5	Ist <i>AbaK8a</i> dem menschlichen K8 ortholog?	84
1.6	Weitere Ergebnisse der MALDI-MS-Analysen	85
2.	<b>Zur molekularen Evolution der IF-Proteine</b>	<b>86</b>
2.1	Die Lamine und die Evolution der IF-Proteine der Metazoen	91
2.1.1	Ein phylogenetischer Baum der Metazoen-Lamine	92
2.1.2	Die Lamin-Sequenz der Tunicaten zeigt nur geringe Identität zu jenen der Vertebraten	94
2.2	Die Typ I-Keratine	96
2.2.1	Stellen die K18-Orthologen die ursprünglichsten Typ I-Keratine dar?	96
2.2.2	Die Stellung der übrigen IF-Sequenzen des Störs im molekularen Stammbaum	99
2.2.3	Einigen Typ I-Keratinen fehlt ein typisches Sequenzmotiv in der Tail-Domäne	100
2.3	Die Typ II-Keratine	102
2.3.1	Ist <i>AbaK8a</i> ein K8-orthologes Protein?	102
2.3.2	Der molekularen Stammbaum der Typ II-Keratine	104
2.4	Die Typ III-IF Proteine Desmin und Vimentin	107
2.4.1	Desmin und Vimentin	109
2.4.2	Desmin und Vimentin weisen Strukturähnlichkeiten auf	111

---

<b>E Zusammenfassung</b>	<b>113</b>
<b>F Anhang</b>	<b>114</b>
<b>1. Verwendete Abkürzungen</b>	<b>114</b>
<b>2. Kurzbezeichnungen der IF-Proteine und Accession-Nr.</b>	<b>115</b>
<b>3. Für die PCR von DNA-Sonden verwendete Primer</b>	<b>117</b>
<b>4. Internetadressen</b>	<b>117</b>
<b>5. Übersicht der sequenzierten IF-Proteine</b>	<b>118</b>
<b>6. Tabellen der MALDI-MS Daten</b>	<b>118</b>
6.1 Typ I-Keratine	119
6.2 Typ II-Keratine	128
6.3 Typ III-Proteine Desmin und Vimentin	132
<b>7. Auswertung der MALDI-MS Analysen</b>	<b>135</b>
<b>8. Nucleotidsequenzen der cDNA-Klone</b>	<b>137</b>
8.1 Typ I-Keratine	137
8.2 Typ II-Keratine	141
8.3 Typ III-Proteine Desmin und Vimentin	143
8.4 Typ V-IF-Protein Lamin	144
<b>G Literatur</b>	<b>146</b>

# A Einleitung

## 1. Das Cytoskelett der tierischen Zelle

Die Pflanzenzelle besitzt zur Wahrung ihrer Struktur eine stabilisierende und formgebende, aber relativ starre Zellwand. Bedingt durch die zumeist beweglichere tierische Lebensweise kommt solch eine Struktur für die tierische Zelle jedoch nicht in Frage. Für die geforderte Reißfestigkeit, Verformbarkeit, Motilität und Form ist das Cytoskelett verantwortlich. Dieses dynamische, dreidimensionale Proteingeflecht erstreckt sich durch das gesamte Cytoplasma. Das Cytoskelett der Chordatenzellen besteht aus drei Typen von Filamenten, die jeweils von einer Multigenfamilie gebildet werden:

Den Aktinfilamenten ( $\varnothing$  4-6 nm), den Mikrotubuli ( $\varnothing$  20-25 nm) und den Intermediärfilamentproteinen ( $\varnothing$  8-16 nm). Die beiden erstgenannten sind hauptsächlich für die Bewegungsvorgänge innerhalb der Zelle zuständig, sie werden auch als Mikro- und Makrofilamente bezeichnet. Ihre polaren Filamente stellen Polymere dar, die von globulären Untereinheiten ( $\alpha/\beta$ -Tubuline bzw. G-Aktin) gebildet werden. Sie unterliegen einem stetigen Auf- und Abbau, ihre Monomere sind daher in großer Zahl im Cytoplasma vorhanden.

Dagegen werden die unpolaren Intermediärfilamente von faserigen Skleroproteinen -den IF-Proteinen- gebildet, deren Monomere nur selten frei in der Zelle anzutreffen sind. Dieses komplexe Protein-Netzwerk erstreckt sich vom Zellkern bis hin zur Plasmamembran und ist hauptsächlich für die Form und Reißfestigkeit der Zelle verantwortlich. Daneben heftet das Netzwerk an Desmosomen an, interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen und cytoplasmatischen Strukturen und übermittelt möglicherweise sogar Informationen (Goldman et al., 1986; Nigg, 1992; Kouklis et al., 1994).

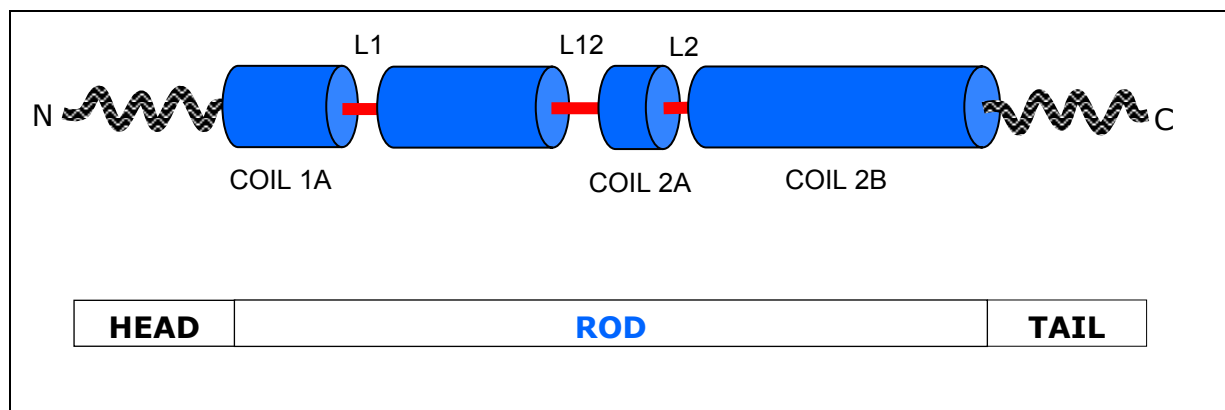
Die IF-Proteine zeigen, im Gegensatz zu den evolutiv hoch konservierten Proteinen der beiden anderen Filamenttypen, eine hohe Diversität. Sie weisen ein gewebsspezifisches und von der Zelldifferenzierung abhängiges Expressionsmuster auf, eine Eigenschaft, die sie zu idealen molekularen Markern in der Entwicklungsbiologie und der Pathologie macht (Lazarides, 1982; Moll et al., 1982; Osborn und Weber, 1983; Fuchs, 1988; Kartenbeck, 1989; LaFlamme und Dawid, 1990a).

Im Rahmen des "Human Genom Projects" wurden 65 Gene nachgewiesen die für IF-Proteine codieren, 49 davon für Keratine, die größte Untergruppe innerhalb der IF-Proteine (Hesse et al., 2001).

## 2. Struktur und Klassifizierung der IF-Proteine

Die einzelnen IF-Proteine unterscheiden sich zum Teil erheblich bezüglich ihrer Molekülmassen und isoelektrischen Punkte, vor allem aber in ihren Primärstrukturen. Dennoch besitzen sie alle die gleiche Sekundärstruktur aus drei Domänen (s. Abb. 1). Eine zentrale  $\alpha$ -helikale Stab- oder „Rod“-Domäne wird von zwei nicht-helikalen Domänen flankiert. Die beiden peripheren Domänen werden aminoterminal als Kopf-Region („Head“) und carboxyterminal als Schwanz-Domäne („Tail“) bezeichnet. Sie variieren in ihrer Länge und Sequenz stark und verleihen den diversen IF-Proteinen ihre jeweilige immunogene oder funktionelle Spezifität (Hanukoglu und Fuchs, 1982; Hanukoglu und Fuchs, 1983; Nagle, 1988; Steinert und Roop, 1988).

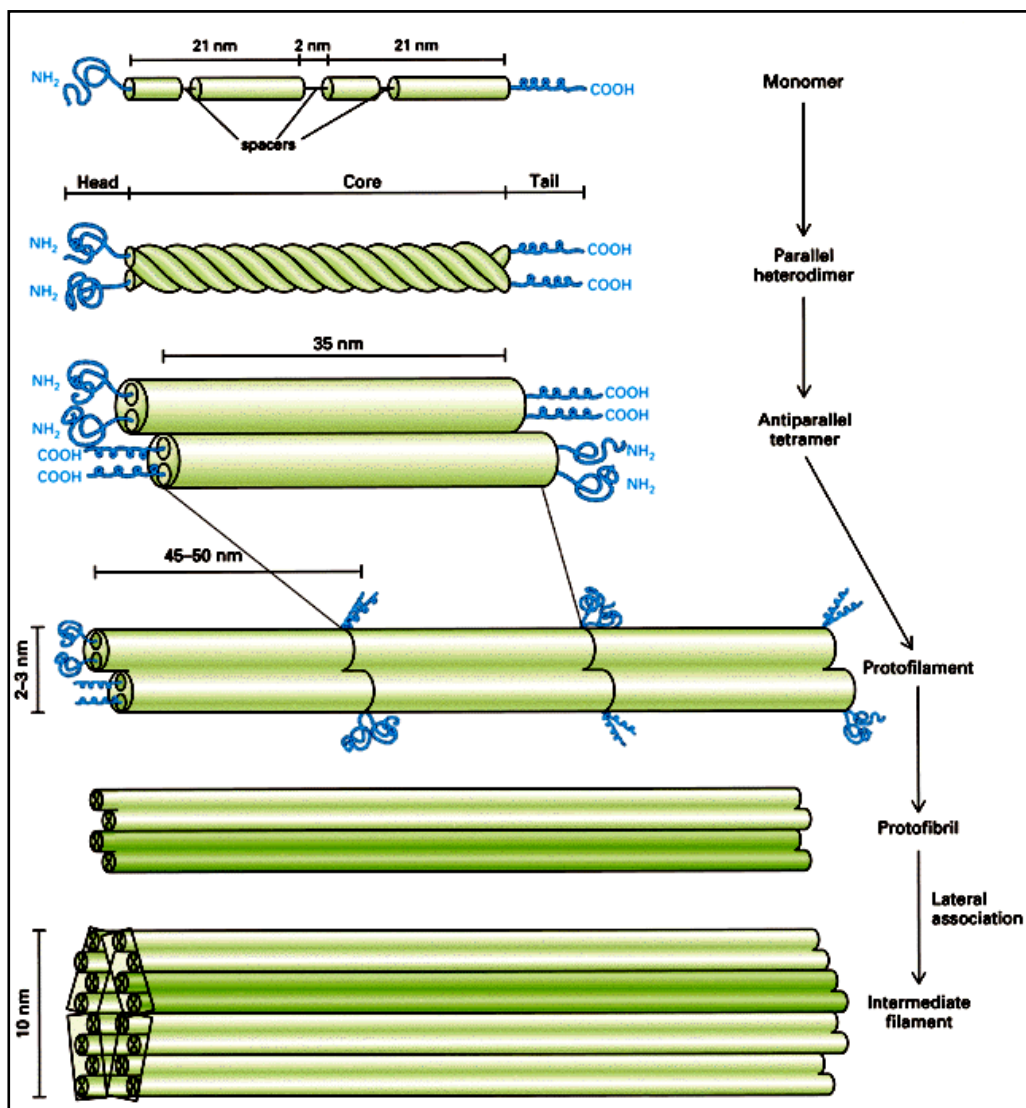
Die zentrale Domäne ist in ihrer Primärstruktur hoch konserviert und weist eine Länge von 310 Aminosäuren auf (bei Laminen etwa 350-360 Aminosäuren). Diese Domäne wird durch drei wenig konservierte, nicht-helikale Spacer, d.h. Lücken- oder „Linker“-Sequenzen (L1, L12 und L2) in vier große  $\alpha$ -helikale „Coils“ getrennt (1A, 1B, 2A und 2B) (Abb. 1) (Conway und Parry, 1988; Albers und Fuchs, 1992; Shoeman und Traub, 1993; Fuchs und Weber, 1994).



**Abb. 1** Schema der Domänen-Struktur von IF-Proteinen. Die schwarzen gewellten Bereiche stellen die nicht-helikale Head-Domäne beziehungsweise Tail-Domäne dar. Die helikalen Bereiche der zentralen Rod-Domäne sind zylinderförmig und blau unterlegt (Coil 1A, 1B, 2A, 2B). Diese sind durch drei nicht-helikale „Linker“ (L1, L12, L2) voneinander getrennt (rot).

Alle Coils der Rod-Domäne lassen eine gewisse Regelmäßigkeit in der Aminosäureanordnung erkennen. Jeweils sieben Aminosäuren bilden eine sogenannte Heptade der Form  $(a-b-c-d-e-f-g)_n$ . Die erste (a) und die vierte (d) Position werden dabei zu 75% von einer hydrophoben Aminosäure besetzt, die restlichen Positionen werden zumeist mit polaren oder geladenen Aminosäuren gefüllt (Hanukoglu und Fuchs, 1982; Steinert und Roop, 1988). Durch die helikale Struktur der Coils entsteht auf der Oberfläche des Monomers ein hydrophobes Band. Dieses ermöglicht die spontane Assoziation von zwei Monomeren zu einer superhelikalen, dimeren „coiled-coil“-Struktur.

Die Bildung dieser parallel aneinandergelagerten Dimere stellt die erste Stufe im hierarchisch geordneten Prozeß der Selbstassemblierung der Intermediärfilamente dar (Hatzfeld und Franke, 1985; Hatzfeld et al., 1987; Coulombe et al., 1990; Coulombe und Fuchs, 1990; Steinert, 1990; Hatzfeld und Weber, 1990a; Hatzfeld und Burba, 1994). Die auf diese Weise entstandenen Dimere sind extrem stabil und lassen sich erst durch hohe Konzentrationen von Harnstoff wieder auflösen (Leube und Kartenbeck, 1996). Im nächsten Schritt der Selbstassemblierung lagern sich zwei Dimere antiparallel und leicht versetzt zu einem Tetramer zusammen (Abb. 2).



**Abb. 2** Schema der Organisationsebenen und Ablauf der Selbstassemblierung von IF-Proteinen. Zwei IF-Proteine lagern sich mit ihren Rod-Domänen parallel zusammen und bilden eine dimere superhelikale „coiled-coil“-Struktur. Zwei solcher Dimere ordnen sich antiparallel und etwas versetzt zu einem Tetramer zusammen. Deren Polymerisation bildet die Protofilamente, die sich wiederum zu Protofibrillen zusammenlagern. Im letzten Schritt bilden sich daraus die Intermediärfilamente. Die Windungen der einzelnen Hierarchieebenen alternieren vermutlich zueinander. Abbildung aus Lodish et al., 1996.

Solche Tetramere können dann zu 2-4 nm dicken Protofilamenten polymerisieren, aus denen vermutlich die 4-5 nm dicken Protofibrillen aggregieren (Geisler et al., 1985; Steinert, 1991b; Steinert et al., 1999b). Im letzten Schritt bilden sich aus zwei bis sechs (zumeist vier) solcher Protofibrillen die 8-16 nm dicken Intermediärfilamente (Albers und Fuchs, 1992; Fuchs und Weber, 1994). Vermutlich alterniert die jeweilige Windung einer Hierarchieebene mit der darüber- und darunterliegenden Ebene (von der rechtshändigen  $\alpha$ -Helix des einzelnen Monomers bis hin zur linkshändigen Protofibrille (Parry und Steinert, 1999). Diese Selbstassemblierung der Intermediärfilamente aus ihren Monomeren verläuft *in vitro* und ohne Hilfe anderer Proteine spontan (Fuchs und Weber, 1994). Durch Phosphorylierung spezifischer Serin-Reste in der „Head“-Domäne kann die Zelle die Anzahl, Länge und Lage der Intermediärfilamente regulieren (Geisler und Weber, 1988; Chou et al., 1989; Nigg, 1992). Der detaillierte Aufbau der Filamente ist noch nicht abschließend geklärt (Geisler et al., 1985; Coulombe und Fuchs, 1990; Steinert et al., 1993a; Steinert et al., 1993b; Kammerer et al., 1998).

Arbeiten zur Röntgenstrukturanalyse liegen noch nicht vor, aber es konnten bereits erfolgreich erste Fragmente von IF-Proteinen kristallisiert werden (Herrmann und Aebi, 2000; Herrmann et al., 2000; Strelkov et al., 2001).

Ähnlichkeiten innerhalb der Sequenzen und den Genstrukturen erlauben es die IF-Proteine bei den Vertebraten in sechs verschiedene Typen einzuteilen:

- Typ I und II wird von der großen Gruppe der Keratine gebildet.
- Zum Typ III gehören neben Desmin, Vimentin auch Peripherin und Saures Gliafilament Protein (GFAP) sowie das Plasticin, welches beim Goldfische und Zebraabärbling während der Regenerationsphase des Sehnervs in den optischen Neuronen gebildet wird (Glasgow et al., 1992; Asch et al., 1998; Markl und Schechter, 1998).
- Die Neurofilament-Proteine (NF-Proteine) bilden den Typ IV. Sie kommen in Neuronen des gesamten Nervensystems vor (Fliegner und Liem, 1991). Ebenso werden das in den Ganglienzellen der Retina von Goldfisch und Zebraabärbling gefundene Gefiltin (Glasgow et al., 1992; Asch et al., 1998; Markl und Schechter, 1998), das in der Xenopus-Retina detektierte Xefiltin (Zhao und Szaro, 1997), das neuronale Xenopus-IF-Protein XNIF (Charnas et al., 1992) und die  $\alpha$ -Internexine zu diesem Typ gezählt.
- Die Proteine vom Typ V werden als Lamine bezeichnet und in drei Gruppen eingeteilt (A, B, C). Sie finden sich auf der Innenseite der Kernhülle, wo sie die Kernlamina aufbauen. Während der Mitose depolymerisieren sie durch Hyperphosphorylierung sehr schnell (Nigg, 1992). Alle bisher untersuchten Lamine weisen eine strukturelle Besonderheit auf, die sie von den anderen cytoplasmatisch exprimierten IF-Proteinen unterscheidet: die zentrale Rod-Domäne ist durch sechs zusätzliche Heptaden im 1B-Coil um ca. 42 Aminosäuren verlängert. Die Proteine vom Typ I-IV und VI sind untereinander ähnlicher als jedes zu den jeweiligen Laminen der Zellkernhülle (Höger et al., 1990; Nigg, 1992; Fuchs und Weber, 1994).

- Zum Typ VI wird das, in neuronalen Stammzellen vorkommende, Nestin (Lendahl et al., 1990; Dahlstrand et al., 1992; Steinert et al., 1999b) gezählt. Eine Zugehörigkeit von Synemin, Paranemin, Tannabin, Syncoilin zu dieser Gruppe wird diskutiert (Hemmati - Brivanlon et al., 1992; Becker et al., 1995; Hemken et al., 1997; Bilak et al., 1998; Newey et al., 2001). Nach Ansicht einiger Autoren (Steinert und Roop, 1988; Fuchs und Weber, 1994; Klymkowsky, 1995) stellen die Proteine vom Typ VI keinen eigenen Protein-Typ dar beziehungsweise werden dem Typ IV zugeordnet (Herrmann und Aebi, 2000).

Zusätzlich sind noch weitere Proteine bekannt, die zwar eine mehr oder weniger große Sequenzhomologie zu den IF-Proteinen aufweisen, aber keine eindeutige Typzuordnung zulassen. Der Schwerpunkt meiner Arbeit lag auf den IF-Proteinen vom Typ I und II, den Keratinen und den beiden Typ III-Proteinen Desmin und Vimentin.

## 2.1 Die Typ I und II IF-Proteine: Keratine

Die Keratine umfassen die Typen I und II der IF-Proteine und stellen die größte und komplexeste Gruppe dar. Ihre besondere Bedeutung wird dadurch unterstrichen, daß beim Menschen mindestens 14 Krankheiten bekannt sind, die im Zusammenhang mit dem funktionellen Ausfall von Keratinen stehen. Die Beschädigung, bereits von Teilen der dreidimensionalen Netzstruktur, führt zum Verlust der Form und Reißfestigkeit der Zelle (McLean und Lane, 1995; Fuchs und Cleveland, 1998; Irvine und McLean, 1999). Innerhalb der Tetrapoden werden Keratine vor allem in Epithelien exprimiert, daneben existieren noch die nagel- und haarbildenden trichocytären Keratine (Heid et al., 1988a; Heid et al., 1988b; Langbein et al., 1999; Langbein et al., 2001; Langbein et al., 2002).

Im ersten Schritt der Keratinfilamentbildung lagert sich *in vivo* stets je ein Typ I mit einem Typ II zu einem Heterodimer zusammen (Hatzfeld und Franke, 1985; Coulombe und Fuchs, 1990; Steinert, 1990; Hatzfeld und Weber, 1990a). Während Keratine *in vitro* mit jedem Vertreter des komplementären Typs Heterodimere bilden können, kommen *in vivo* je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium nur bestimmte „Expressionspaare“ vor (Hatzfeld et al., 1987).

Die Keratintypen I und II können bei den Landwirbeltieren nicht nur aufgrund ihrer Molekülmassen und Aminosäuresequenzen, sondern auch durch ihre isoelektrischen Punkte (pI) unterschieden werden (Eichner et al., 1984; Bader et al., 1988). Die meisten Typ II-Keratine sind schwerer und weisen einen mehr basischen ( $6 < pI < 8$ ) isoelektrischen Punkt auf als die Typ I-Keratine ( $4 < pI < 6$ ). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Vertretern der niederen Wirbeltiere (Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss*, Zebraärbling *Danio rerio* und Katzenhai *Scyliorhinus stellaris*) zeigten, daß hier die Keratine Unterschiede in ihren biochemischen Eigenschaften und im Expressionsmuster aufweisen.

Wegen der geringeren Bandbreite bei Größe und Ladung ist hier eine Unterteilung in „saure“ Typ I- und „basische“ Typ II-Keratine, wie bei den terrestrischen Vertebraten, wenig sinnvoll (Markl et al., 1989; Conrad et al., 1998; Schaffeld et al., 1998).

Die epithelialen Keratine der bis heute untersuchten Wirbeltiere können aber auf Grund ihrer gewebe-spezifischen Expression weiter unterteilt werden: Keratine die typischerweise in Zellen einschichtiger Epithelien, wie z.B. Darmmukosa, Hepatocyten oder Nierentubuli vorkommen, werden als „S“-Keratine bezeichnet (von „simple epithelial“). Im Gegensatz dazu werden die Keratine der mehrschichtigen Epithelien wie der Epidermis als „E“-Keratine bezeichnet (von „epidermal“) (Markl et al., 1989; Markl und Schechter, 1998; Schaffeld et al., 1998).

Durch die übergeordnete Trennung in Typ I und Typ II können so vier Keratin-Subtypen, die sowohl in Tetrapoden, als auch in niederen Wirbeltieren auftreten, unterschieden werden: **I<sub>E</sub>, I<sub>S</sub>, II<sub>E</sub> und II<sub>S</sub>**.

Jede Wirbeltierart besitzt eine charakteristische Ausstattung von Keratinen dieser Untergruppen. Zu zwei zunächst beim Menschen entdeckten „S“-Keratinen, K8 (Typ II) und K18 (Typ I), konnten in allen bisher untersuchten gnathostomen Wirbeltieren (Kiefernfüßer) Orthologe gefunden werden. Während der Ontogenese von Amphibien und Säugern bildet dieses heterologe Paar die ersten Intermediärfilamente (Franz et al., 1983; Franz und Franke, 1986; Bader et al., 1988; Fouquet, 1991). Die Gene, die für diese beiden Proteine codieren, liegen beim Menschen direkt benachbart auf Chromosom 12 (Hesse et al., 2001).

## 2.2 Die Typ III-Proteine Desmin und Vimentin

Von den Keratinen unterscheiden sich die Typ III-Proteine im Allgemeinen dadurch, daß sie im ersten Schritt ihrer Selbstassemblierung meist Homodimere bilden. Jedoch wurden *in vitro*, und seltener *in vivo* auch Heterofilamente mit anderen Typ III-Proteinen beobachtet. Ebenfalls *in vitro* konnten Heterodimerisierungen mit allen Vertretern der Typ IV-Proteine und dem Typ VI-Protein Nestin nachgewiesen werden. (Steinert et al., 1981; Quinlan und Franke, 1982; Traub et al., 1993). Eine Kopolymerisation mit den Keratinen findet jedoch weder *in vivo* noch *in vitro* statt (Stewart, 1993; Cary und Klymkowsky, 1994a).

Die Hauptvertreter der Typ III-Proteine sind Desmin und Vimentin. Sie ähneln sich in ihrer Primärstruktur sehr und sind untereinander näher verwandt als mit jedem Keratin. Ihre primäre Aminosäure-abfolge zeigt bei den Vertebraten zwar signifikante, aber insgesamt doch nur geringe Unterschiede. Ebenso zeigen die restlichen bisher sequenzierten Typ III-Proteine einen hohen Grad an Konservierung (Ferrari et al., 1986; Li et al., 1989; Herrmann et al., 1989a; Herrmann et al., 1989b; Herrmann et al., 1996b; Schaffeld et al., 2001b). Der hohe Konservierungsgrad wird durch starke selektive Mechanismen bedingt.

Dies gilt besonders für Desmin, das anscheinend speziell für die Stabilität von Muskelzellen verantwortlich ist (Capetanaki et al., 1997; Li et al., 1997). Bei gnathostomen Wirbeltieren ist Desmin das typische IF-Protein aller Typen von Muskelgewebe (Skelettmuskulatur, glatte Muskulatur und Herz), wo es sich vor allem in der Z-Scheibe konzentriert (Lazarides et al., 1982; Herrmann et al., 1989b; Loh Soh et al., 2000; Schaffeld et al., 2001b).

Die Abwesenheit von Desmin verursacht (bei Mäusen) schwere Schäden an den Muskelzellen des Herzens und der glatten Muskulatur (Li et al., 1996), während Tiere mit einem Mangel an Vimentin sich normal zu entwickeln scheinen (Colucci Guyon et al., 1994). Allerdings zeigen solche Tiere eine verschlechterte Wundheilung (Eckes et al., 2000) und ihre Astrocyten, in denen normalerweise Vimentin und GFAP koexprimiert werden, bilden keine funktionierenden GFAP-Netzwerke mehr (Galou et al., 1996).

### **2.3 Die Typ V-Proteine: Lamine**

Die Lamine sind die Hauptstruktur-Proteine der Kernhülle, sie verleihen ihr die notwendige Stabilität (Lenz-Böhme et al., 1997). Darüber hinaus sind sie vermutlich am Neuaufbau der Hülle nach der Mitose, der Verankerung der Poren-Komplexe, der Chromatin-Bindung und der DNA-Replikation beteiligt (Nigg, 1992; Stuurman et al., 1998; Moir et al., 2000). Entsprechend ihrer funktionellen Bedeutung sind sie in ihrer Sequenz durch das gesamte Tierreich hindurch hoch konserviert. Sie stellen die vermutlich ursprünglichste aller IF-Proteinklassen dar (Erber et al., 1999) und aus ihnen haben sich wahrscheinlich auch die IF-Proteine der Protostomier gebildet. Obwohl im Allgemeinen angenommen wird, daß die Lamine in allen Eukaryoten vorkommen, konnten bisher noch keine außerhalb der Metazoen nachgewiesen werden.

Die cytoplasmatischen IF-Proteine ähneln den Laminen in ihrer Sequenz, Domänen-Struktur und Eigenschaften beim Zusammenlagern (Fuchs und Weber, 1994) (Stuurman et al., 1998). Dies gilt besonders für die cytoplasmatischen IF-Proteine der Protostomier. Sie weisen, ebenso wie die Lamine, 42 zusätzliche Aminosäuren (sechs Heptaden) im 1B-Coil der Rod-Domäne auf (Weber et al., 1988; Weber et al., 1989b; Erber et al., 1998). Zusätzlich enthält die Tail-Domäne zumeist noch eine Insertion von etwa 105 Aminosäuren, deren Genstruktur stark konserviert ist (Döring und Stick, 1990; Riemer et al., 1998; Riemer und Weber, 1998). Änderungen in der Länge dieses Segments treten meist nur zwischen den konservierten Motiven auf. In den bisher bekannten cytoplasmatischen IF-Proteinen der Deuterostomier kommen die beiden genannten Merkmale hingegen nicht vor.

Die cytoplasmatischen IF-Proteine der Protostomier sowie der Deuterostomier zeigen jedoch auch Unterschiede zu den Laminen (Weber et al., 1989b; Dodemont et al., 1994; Erber et al., 1998) (Erber et al., 1999). So fehlt ihnen am hinteren Ende der Rod-Domäne ein sogenanntes Kernlokalisierungsmotiv, wie es bei allen Laminen auftritt. Dieses umfaßt vier basische Aminosäuren, beginnend mit einem konservierten Lysin (K). Außerdem endet die Peptidsequenz nicht wie bei den Laminen mit einer terminalen CaaX-Box. Dieses Motiv konnte auch beim „mating factor“ der Hefe und *ras*-Proteinen gefunden werden (Hancock et al., 1989).

Trotz der genannten Unterschiede zwischen den cytoplasmatischen IF-Proteinen und den Laminen gibt es deutliche Hinweise darauf, daß die IF-Proteine aus einem Lamin-ähnlichen Protein hervorgegangen sind. So fand vermutlich folgende Entwicklung innerhalb der Metazoen statt:

Die einfache Deletion zweier Sequenzmotive in der Tail-Domäne führte zu den cytoplasmatischen IF-Proteinen der Metazoen. Sie sind in dieser Form bei allen Protostomieren erhalten geblieben. Durch Verlust der sechs Heptaden im 1B-Coil entstanden daraus die IF-Proteine der rezenten Chordaten. Gestützt wird diese Vermutung unter anderem auch durch die Genstrukturen der IF-Proteine. Wann es innerhalb der Deuterostomier zu dem Verlust der sechs Heptaden gekommen ist, läßt sich zur Zeit noch nicht sagen, da von den Echinodermaten und Hemichordaten noch keine Sequenzinformationen von cytoplasmatischen IF-Proteinen vorliegen.

Die Hauptlamintypen der Vertebraten werden nach ihrer Domänen-Struktur, ihrem Verhalten während der Mitose (Gerace und Blobel, 1980; Stick et al., 1988) und ihrem Expressionsmuster (Röber et al., 1989) unterschieden.

- Die Typ B-Lamine werden generell in allen Zellen exprimiert und überdauern die Mitose membran-gebunden. Die bisher bekannten Lamine der Invertebraten (von *Hydra* bis *Branchiostoma*) gleichen in ihrer Größe diesem Lamin-Typ.

- Die Typ A-Lamine hingegen werden abhängig vom Entwicklungszustand exprimiert und gehen während der Mitose in Lösung (Weber et al., 1989a). Sie treten anscheinend nur bei den Vertebraten auf und sind vermutlich durch Genduplikation und Insertion eines Exons vor der CaaX-Box aus den Typ B-Laminen hervorgegangen und daher länger als letztere (Stick, 1992; Stick, 1994) (Erber et al., 1999). Nach Einbau in die Kernlamina verlieren sie ihre terminale CaaX-Box durch proteolytische Reifung.

- Die Typ C-Lamine stellen höchstwahrscheinlich eine Splice-Variante der Typ A-Lamine dar. Dabei wird die Sequenz im Tail-Bereich verkürzt, ihnen fehlt deswegen die CaaX-Box. Sie werden mit den Typ A-Laminen koexprimiert und kommen vermutlich nur bei den Mammalia vor.

Allen Vertebraten-Laminen ist ein Cluster aus 7-12 sauren Aminosäuren gemeinsam, der nicht bei den Invertebraten vorkommt. Dieser Cluster tritt vor dem weiter oben erwähnten Lamin-homologen Motiv im Tail und der terminalen CaaX-Box auf (Erber et al., 1999). Es wird daher vermutet, daß dieses Sequenzmotiv erst innerhalb der Vertebratenlinie und nach der Trennung in A- und B-Lamine evolvierte.

Zusätzlich zu der oben beschriebenen Entwicklung der Typ A, B, C-Lamine kam es innerhalb der Vertebraten zu einer weiteren Ausweitung der Lamine. Durch Genduplikation eines Typ B-Lamins evolvierten die Subtypen B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>.

Ein weiterer Subtyp konnte zuerst bei *Xenopus laevis* (LIII) identifiziert werden. LIII tritt nur in den Oocyten und im frühen Entwicklungsstadium auf und gleicht in der Größe und Genstruktur sehr den Laminen vom Typ B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> (Stick, 1988). Dennoch ist die Sequenz durch Gendrift stark verändert, weswegen eine Einstufung in einen eigenen Subtyp (B<sub>3</sub>) erfolgte. Es war anfangs allerdings nicht klar, ob diese Sequenz nur eine funktionale Adaption dieses einen Lamins oder einen eigenen Lamin-Typen darstellt. Inzwischen konnten auch aus den Oocyten vom Goldfisch *Carassius auratus* (Yamaguchi et al., 2001) und dem Zebrafisch *Danio rerio* (Hofemeister et al., 2002) entsprechende Sequenzen gewonnen werden.

### 3. Die Evolution der Intermediärfilamentproteine

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Geweben zahlreicher Invertebraten bezüglich ihrer IF-Proteine untersucht. Die dabei gefundenen Invertebraten-IF-Proteine konnten, mit Ausnahme der Lamine, keinem der von den Vertebraten bekannten IF-Typen direkt zugeordnet werden (Bartnik und Weber, 1989; Fuchs und Weber, 1994).

Bei fast allen Protostomiern wurden sowohl neuronale, als auch nicht-neuronale IF-Proteine gefunden. Einzig bei den Arthropoden konnten bisher keine solche Polypeptide nachgewiesen werden (Bartnik und Weber, 1989). Es kann daher vermutet werden, daß die Ausbildung eines stabilen Exoskeletts, die wichtigste evolutive Synapomorphie der Arthropoden, die Bildung eines zellstabilisierenden Netzwerkes überflüssig machte. Alle bisher sequenzierten cytoplasmatischen IF-Proteine von Mollusken, Nematoden und Anneliden haben im 1B-Coil der zentralen Rod-Domäne sechs zusätzliche Heptaden (ca. 42 Aminosäuren), ein strukturelles Merkmal, das typisch ist für Typ V-IF-Proteine, die Lamine. Außerdem enthalten die meisten dieser IF-Proteine in ihrer terminalen Domäne ein lamin-homologes Segment.

Diese und weitere Eigenschaften sprechen dafür, daß sich bei den protostomen Invertebraten die ersten cytoplasmatischen IF-Proteine aus den ubiquitären Laminen der Zellkerne bildeten. Hierfür mußte zuerst das in der Tail-Domäne liegende Signal für die Zellkernlokalisierung der Lamine verlorengehen. (Loewinger und McKeon, 1988; Weber et al., 1988; Weber et al., 1989b; Dodemont et al., 1990; Riemer et al., 1991; Szaro et al., 1991; Tomarev et al., 1993; Dodemont et al., 1994; Adjaye et al., 1995; Bovenschulte et al., 1995; Erber et al., 1999).

Innerhalb der Deuterostomia wurden IF-Proteine bei Echinodermaten zwar schon biochemisch nachgewiesen, es liegen aber noch keine Sequenzdaten vor. Die Frage, ob das Auftreten von „kurzen“ IF-Proteinen, also solche ohne sechs zusätzliche Heptaden im 1B-Coil, auf die Chordatenevolution beschränkt ist oder bereits mit den Deuterostomiern auftrat, kann daher zur Zeit noch nicht beantwortet werden (St-Pierre et al., 1994; Holy, 2000).

Von wirbellosen Chordaten liegen Informationen über IF-Proteinen von den beiden Cephalochordaten *Branchiostoma floridae* und dem Lanzettfischchen *Branchiostoma lanceolatum* sowie einigen Tunicaten (Urchordat) vor (Riemer et al., 1992; Riemer et al., 1998; Wang et al., 2000). Diese zeigen funktionelle und auch strukturelle Ähnlichkeiten mit den IF-Proteinen vom Typ I-III der Vertebraten. Alle dreizehn bislang von *Branchiostoma* sequenzierten cytoplasmatischen IF-Proteine beinhalten die kürzere Version der Rod-Domäne, ohne ausgedehnten 1B-Coil. Fünf davon konnten bestimmten Keratin-Typen zugeordnet werden. Von dem Tunicaten *Styela* sind vier cytoplasmatische IF-Proteine bekannt, von denen zwei Heteropolymere miteinander bilden. Eines davon kann sich mit dem Typ II-Keratin K8 des Krallenfroschs *Xenopus* zusammenlagern, es zeigt also Eigenschaften eines Typ I-Keratins (Riemer und Weber, 1998; Wang et al., 2000). Die beiden anderen Proteine bilden zumindest *in vitro* Homopolymere. Eines hiervon besitzt in der Head-Domäne ein konserviertes Motiv, das auch bei Typ III und IV-Proteinen von Wirbeltiere vorhanden ist (Karabinos et al., 2000). Dieses Motiv ist für die Assemblierung der Typ III-Proteine essentiell (Herrmann, 1995; Herrmann et al., 1996a). Obwohl die Genstruktur aller dieser Proteine denen der Intermediärfilamente von Vertebraten ähnelt, sind die Unterschiede doch so groß, daß eine Einteilung in Typ I bis III-IF-Proteine alleine an Hand der Aminosäuresequenzen nicht möglich ist. Die Typisierung erfolgt daher eher nach funktionellen Kriterien (Parry und Steinert, 1999).

Die Aufspaltung der IF-Proteine in die Typen I-III, wie man sie bei den höheren Vertebraten unterscheidet, scheint also erst innerhalb der Wirbeltierevolution stattgefunden zu haben. Bereits bei den Agnathen ist eine Unterscheidung in die verschiedenen Typen alleine durch Sequenzvergleiche möglich (Schultess, 2001). Die Hypothese einer Diversifikation der IF-Proteine erst innerhalb der Wirbeltierevolution, wird auch von der Funktion der Intermediärfilamente gestützt. Im Zuge des Übergangs vom langsamen inaktiven Strudler, hin zum stark beweglichen Jäger erfolgte eine Anpassung der Gewebe an ihre neue Aufgabe. Sie erhielten Struktur und Reißfestigkeit, ohne jedoch an Flexibilität zu verlieren.

#### 4. Das IF-Proteinsystem bei Fischen und Ziel der Arbeit

Wie bereits einleitend erwähnt gibt es bei höheren Wirbeltieren, wie zum Beispiel dem Menschen ein sehr komplexes System von IF-Proteinen (Hesse et al., 2001). Um besser verstehen zu können, wie und wann innerhalb der Wirbeltierevolution diese enorme Vielfalt entstanden ist, wurden Untersuchungen an verschiedenen Vertretern der Teleostern durchgeführt, der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* (Markl und Franke, 1988; Markl et al., 1989), dem Goldfisch *Carassius auratus* (Giordano et al., 1989; Giordano et al., 1990), dem Zebraquarienfisch *Danio rerio* (Cerdea et al., 1998; Conrad et al., 1998) und dem Karpfen *Cyprinus caprio* (Groff et al., 1997; Mencarelli und Cotelli, 1997; Markl und Schechter, 1998).

Die ermittelten Ergebnisse warfen aber neue Fragen auf. Zwar konnten die gefundenen IF-Proteine den verschiedenen Typen, wie sie bei terrestrischen Vertebraten vorkommen, zugeordnet werden, es zeigte sich aber ein fundamental anderes Expressionsmuster als bei diesen.

Bei Teleostern ist das Vorkommen von Keratinen nicht auf Epithelien beschränkt, sondern auch auf mesenchymale Zelltypen verbreitet (Markl und Franke, 1988; Markl et al., 1989; Bunton, 1993; Bauer, 1996; Groff et al., 1997; Conrad et al., 1998). Dafür ist Vimentin nur auf eine kleine Anzahl bestimmter Zelltypen spezialisiert (Herrmann et al., 1996b; Cerdea et al., 1998).

Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe von zwei Wirbeltieren, deren Klassen näher an der Basis der Wirbeltierevolution abzweigen, zeigten, daß diese Art der Expression offenbar nur bei Knochenfischen auftritt. Sowohl beim Neunauge *Lampetra fluviatilis*, ein Agnath (Schultess, 2001), als auch beim Katzenhai *Scyliorhinus stellaris* einem Vertreter der Knorpelfische (Schaffeld et al., 1998) findet sich ein den terrestrischen Vertebraten ähnliches Expressionsmuster.

Um Aufzuhellen, wann innerhalb der Evolution der Knochenfische das beschriebene „Teleostermuster“ auftritt, beschäftigte ich mich im Rahmen meiner Arbeit mit dem Sibirischen Stör *Acipenser baeri*. Vor etwa 430 Millionen Jahren kam es zur Auftrennung der Knochenfische in die Fleischflosser (Sarcopterygii) und die Strahlenflosser (Actinopterygii). Die Störe (*Acipenser*) gehören zu den Strahlenflossern, von deren Stammbaum sie sich vor etwa 400 Millionen Jahren abtrennten. Damit stehen die Störe sehr basal im Stammbaum der Fische. Nach einigen Systematikern zweigen nur noch die Flösselhechte (Polypterini) früher ab (vor ca. 410 Mio. Jahre). Von einigen Systematikern werden aber die Störe basaler gestellt, beziehungsweise eine Monophylie der beiden Taxa diskutiert (Siewing, 1985; Fiedler, 1991; Nelson, 1994). Viele Merkmale der Störe sind als altertümlich anzusehen, was insbesondere die Persistenz einer Chorda, das weitgehend knorpelige Innenskelett, die Reduktion des Schuppenpanzers sowie die Ausbildung eines Rostrums betrifft (Marinelli und Strenger, 1953).

Bisher lagen keinerlei Informationen über IF-Proteine bei Stören vor. Ziel meiner Arbeit und einer von mir mitbetreuten Diplomarbeit von Nicole Tappe (2000) war es daher IF-Proteine vom Typ I-III über eine cDNA-Bank zu sequenzieren und ihr Expressionsmuster an Hand von Gefrierschnitten und proteinbiochemischen Methoden zu charakterisieren.

## B Material und Methoden

### 1. Chemikalien und Geräte

Die üblichen Laborchemikalien stammten von den Firmen Roche (Mannheim, vormals Boehringer), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Handelsübliche Petrischalen wurden von Greiner (Frickenhäusen) 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) durchgeführt. Falcons wurden in einer kühlbaren Heraeus Megafuge 1.0R zentrifugiert. Außerdem kam eine Sorvall Kühlzentrifuge (RC5B) mit unterschiedlichen Rotoren zum Einsatz. Zur Auswertung von Agarosegelen wurden UV-Transilluminatoren der Wellenlängen 366 nm und 254 nm von Bachofer (Reutlingen) verwendet. Weiterhin verwendete Chemikalien und Geräte werden an den entsprechenden Stellen im Text erwähnt.

### 2. 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 (Diethyl-pyrocyanat) behandeltes H<sub>2</sub>O sowie gestopfte Pipettenspitzen und Latex-Handschuhe verwendet. Zum verbesserten Schutz vor Ethidiumbromid wurden im Umgang mit den entsprechenden Gelen Handschuhe aus Nitril benutzt.

### 3. Das Forschungsobjekt

Der Sibirische Stör *Acipenser baeri* findet seine Verbreitung in allen größeren Flüssen Sibiriens, den angrenzenden Küstengebieten sowie dem Baikalsee. Die Versuche einer Einbürgerung in die Flüsse Europas sowie der Ostsee Mitte der sechziger Jahre schlugen fehl. Es werden zwei Unterarten unterschieden, die typische Form *Acipenser baeri baeri* und *Acipenser baeri stenorrhynchus*, welche sich hauptsächlich durch die Schnauzenlänge unterscheiden. Teilweise haben sich in den jeweiligen Fluß-

systemen eigene Populationen gebildet. Von den Flüssen Ob, Irtisch und Yenisei ist bekannt, das es zu Kreuzungen mit dem Sterlet *Acipenser ruthenus* gekommen ist. Der Sibirische Stör ist wie einige andere Störe nicht Diploid sondern Tetraploid (Ludwig et al., 2001).

In freier Natur kann der Sibirische Stör bis zu 2 m lang, 200 kg schwer und 60 Jahre alt werden. Seine Nahrung besteht hauptsächlich aus Insektenlarven und Krebsen, die durch Einsaugen aufgenommen werden. Dabei werden auch beträchtliche Mengen an Detritus aufgenommen (Holcik, 1989; Hochleithner, 1996).

Die für meine Arbeit bestimmten Tiere wurden uns freundlicherweise von der Fischzucht Rhönforelle (Gersfeld) zur Verfügung gestellt. Eine Geschlechtsbestimmung von außen war auf Grund des jungen Alters der zwei ca. 25 cm langen Exemplare nicht möglich. Ein Tier wurde sofort getötet, das Andere wird zur Zeit noch in einem Süßwasseraquarium, bei 19°C Wassertemperatur, gehältert. Zur Fütterung werden kleingeschnittene Filetstücke verschiedener Speisefische sowie gefriergetrocknete Zuckmückenlarven verwendet. Gelegentlich werden auch lebende Guppys zugefüttert (Holcik, 1989; Hochleithner, 1996).

Der Stör wurde mit 400 mg/l MS222 (3-Aminobenzoessäure-ethylester-methansulfonsäure; Serva, Heidelberg) narkotisiert. Nach tiefem Einschneiden des Schwanzes hinter dem After wurde das Tier durch Ausbluten getötet, danach wurde die Leibeshöhle vom After her eröffnet.

### 3.1 Systematische Einordnung des Sibirischen Störs (*Acipenser baeri*)

Innerhalb der Wirbeltiere stellen die Fische eine paraphyletische Gruppe der Kiefermäuler (Gnathostomata) dar. Als artenreichste Überklasse der Vertebraten umfaßt sie nach Fiedler (1991) vier Klassen:

- Placodermi (Panzerfische) †
- Acanthodii (Stachel“haie“) †
- Chondrichthyes (Knorpelfische)
- Osteichthyes (Knochenfische)

Die Gattung *Acipenser* gehört zu den Osteichthyes (Knochenfischen), die mit mindestens 30.000 Arten und Verbreitung in allen Meeren und Süßwasserhabitaten die größte Klasse innerhalb der Wirbeltiere stellt (Campbell, 1996). Von den heutigen Chondrichthyes und den Agnathen unterscheiden sie sich durch die Ausbildung von Knochen im Skelett, außerdem sind stets Kiemendeckel vorhanden und die Kiemenbögen tragen Kiemenblättchen. Kennzeichnend ist desweiteren das Lungen-Schwimmbblasensystem, welches ursprünglich eine paarige, luftgefüllte Ausstülpung des Vorderdarms mit Atemfunktion, später ein hydrostatisches Organ darstellt. Bereits im Devon trennten sich die Knochenfische in die beiden heute existierenden Unterklassen Actinopterygii (Strahlenflosser) und

Sarcopterygii (Fleischflosser) (Campbell, 1996). Erstere sind bereits seit diesem Zeitalter sehr artenreich und stellen etwa 99% der heutigen Fische. Infolge der Ausbildung einer Schwimmblase reduzieren die paarigen Flossen ihre Funktion als Stütz- und Bewegungsorgan. Der Hauptbestandteil der Flossen ist häutig und wird von Flossenstrahlen gestützt. Die Entwicklung dieser Unterklasse zeigt drei Schichten: eine alte (Chondrostei), eine mittlere (Holostei) und eine neue (Teleostei). Die beiden ersten Schichten erreichten im Karbon, beziehungsweise im jüngeren Mesozoikum, eine reiche Formenfülle, während die letzte Schicht seit der Kreide eine stetige Ausweitung erfährt. Die Störe gehören als Vertreter der Knorpelganoide zur Altschicht.

Auffallend ist das altertümliche Äußere der Störe. Einige der Merkmale, wie zum Beispiel das knorpelige Skelett und die heterozerke Schwanzflosse erinnern stark an die Haie. Die Störe wurden daher in der Vergangenheit (z.B. von Cuvier) gelegentlich den Knorpelfischen zugeordnet (Marinelli und Strenger, 1953).

Stamm	Chordata (Chordatiere)
Unterstamm	Vertebrata (Wirbeltiere)
Überklasse	Gnathomata (Kiefermänder)
Klasse	Osteichthyes (Knochenfische)
Unterklasse	Actinopterygii (Strahlenflosser)
Überordnung	Chondrostei (Knorpelganoide)
Ordnung	Acipenseriformes (Störartige)
Familie	Acipenseridae (Rüsselstöre)
Unterfamilie	Acipenserinae (Echte Störe)
Gattung	<i>Acipenser</i> (Störe)
Art	<i>Acipenser baeri</i> (Sibirischer Stör)

### 3.2 Gewebepräparation

Die gesamte Präparation erfolgte auf einem Eisbett. Gewebe für die Biochemie (siehe B 5.) wurden direkt in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und dann zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Gewebe für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe B 13.) wurden in Isopentan aufgenommen, dieses war mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Isopentan leitet die Kälte schnell in das Gewebe und hilft so Schäden beim Einfrieren zu minimieren. Nach wenigen Minuten wurden die Präparationen, mit Isopentan im Überschuss, bei -80°C eingefroren. Gewebe aus denen mRNA extrahiert werden sollte wurden mit gekühltem GTC (siehe B 15.) aufgenommen und auf Eis mehrfach mit einem Ultra-Turrax (IKA-Werk, Staufen i. Breisgau) homogenisiert. Die Homogenisate wurden ebenfalls bei -80°C tiefgefroren.

## 4. Verwendete Antikörper

### 4.1 Antikörper gegen Keratine

**Tab. 1** Verwendete Antikörper gegen Keratine

Antikörper	Subklasse	Antigen	Quelle	Zitat
1.3	mK / IgM	xK2/18 u. xK X	H. Herrmann	(Fouquet, 1991)
164.4	mK / IgG 1	xK 1/8	H. Herrmann	(Fouquet, 1991)
26.8	mK / IgG1	xK 1/8	H. Herrmann	(Fouquet, 1991)
46.6	mK / IgM	xK 1/8	H. Herrmann	(Fouquet, 1991)
68.4	mK / IgG 1	xK18	H. Herrmann	(Fouquet, 1991)
79.14	mK / IgG 1	xK 1/8	H. Herrmann	(Fouquet, 1991)
AE1	mK / IgG1	Typ I Keratine	Progen	(Woodcock-Mitchell et al., 1982)
AE3	mK / IgG 1	Typ II Keratine	Progen	(Woodcock-Mitchell et al., 1982)
CO4 = (Ks18.04)	mK / IgG 1	hK 18	Progen	(Bartek et al., 1991)
F1F2	mK	S-Keratine	M. Conrad	(Conrad et al., 1998)
GPT4*	Meerschweinchen	Forellenkeratine	J. Markl	(Conrad et al., 1998)
GPT5*	Meerschweinchen	S-Keratine	J. Markl	(Conrad et al., 1998)
IFA	mK / IgG 1	Säuger-IF	Pruss	(Pruss et al., 1981)
K8.13	mK / IgG 2a	hK	Sigma	(Gigi et al., 1982)
K8.60	mK / IgG 1	hK 1, 10/11	Progen	(Huszar et al., 1986)
KL1	mK / IgG 1	hK 1,2,5	Dianova	(Viac et al., 1983)
Ks pan 1-8	mK / IgG 2a	Typ II Keratine	Progen	(Achtstätter et al., 1989)
Ks19.2	mK / IgG 2b	hK 19	Progen	(Bader et al., 1988)
Lu5	mK / IgG 1	hK 1-19	Boehringer	(Franke et al., 1987b)

mK, monoklonal; pK, polyklonal; xK, *Xenopus laevis* Keratin; hK, humanes Keratin; (\*) die Kombination von GPT4 und GPT5 wurde als GP<sub>poly</sub> bezeichnet

## 4.2 Antikörper gegen Desmin und Vimentin

**Tab. 2** Verwendete Antikörper gegen Vimentin und Desmin

Antikörper	Subklasse	Antigen	Quelle	Zitat
De-B-5	mK / IgG 1	Humanes Desmin	Boehringer Mannheim	(Debus et al., 1983a)
DES	pk	Desmin Huhn	Sigma	(Debus et al., 1983a)
Vim 14.13	mk / IgG 1	Xenopus-Vimentin	H. Herrmann	(Fouquet, 1991)

mK, monoklonal; pK, polyklonal

## 4.3 Antikörper gegen Neurofilamentproteine

**Tab. 3** Verwendeter Antikörper gegen Neurofilament

Antikörper	Subklasse	Antigen	Quelle	Zitat
Ne14 = NF200	mK / IgG 1	Neurofilament		

mK, monoklonal; pK, polyklonal

## 5. Biochemische Präparation der Intermediärfilamente (Cytoskelett-Präparation)

Zur Extraktion von Intermediärfilamenten (IF) aus Geweben nutzt man zwei besondere physikochemische Eigenschaften dieser Proteine:

- IF lösen sich schlecht, bzw. gar nicht in nicht-ionischen Detergentien (z.B. Triton®)
- IF lösen sich schlecht in Hochsalzlösungen von z.B. KCl oder NaCl

### 5.1 Extraktionslösungen

#### Niedrigsalzpuffer

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

<b>Hochsalzpuffer</b>	1,5 M KCl 10 mM Tris/Cl pH 7,2 5 mM EDTA 1% Triton® X-100
<b>TE-Puffer</b>	10 mM Tris/Cl pH 7,2 5 mM EDTA

Zur Hemmung von Proteasen wurde direkt vor Gebrauch der jeweiligen Pufferlösung ein Gemisch von Proteasehemmern zugesetzt. PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und Pepstatin A wurden zuvor als Stammlösungen in Ethanol p.A. gelöst, Leupeptin und Benzamidin in dest. H<sub>2</sub>O. Es kamen folgende Endkonzentrationen zum Einsatz:

PMSF	2 mM (Stammlösung 0,38 M)
Pepstatin A	0,7 µg/ml (Stammlösung 1 mg/ml)
Leupeptin	4 µg/ml (Stammlösung 5 mg/ml)
Benzamidin	1 mM (Stammlösung 2 mM)

## 5.2 Extraktion der Intermediärfilamente aus Gewebe

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Zur Homogenisierung wurde ein Ultra-Turrax des IKA-Werkes verwendet. Die bei der Präparation eingefrorenen Gewebe wurden mit dem vierfachen Volumen eiskühlem Nidrigsalzpuffer aufgenommen und homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 4°C mit 15000 Upm im SS34 Rotor der Sorvall Kühlzentrifuge für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und zu dem Sediment ein gleiches Volumen eiskaltem Hochsalzpuffer zugegeben. Es folgte eine erneute Homogenisation und Zentrifugation (siehe oben). Diese Hochsalzextraktionen wurden noch zwei-, dreimal wiederholt und das Pellet dann in ein oder mehrere 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Zur Entfernung von überschüssigen Salzen und Detergentien folgten mehrere Waschschrirte. Dabei wurde das Pellet mit einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde in einer Mikroliter Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) bei 100% für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach dem letzten Waschgang wurden die Pellets entweder bei -80°C gelagert oder direkt für die entsprechenden Elektrophoresen vorbereitet.

## 6. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE)

Die Elektrophorese erfolgte nach dem denaturierenden und diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970), wobei die Proteine nach Molekülgröße getrennt werden. Anstelle von Mercaptoethanol wurde jedoch DTT als reduzierendes Agens verwendet. Das System bestand aus einem grobmaschigen Sammelgel und einem höher vernetzten Trenngel, welche sich außerdem noch im pH Wert unterschieden. Als Folgeanion im Elektrophoresepuffer diente Glycerin. Verwendet wurde die vertikale Elektrophoresekammer PHERO – minivert von Biotec Fischer (Reiskirchen) für zwei Gele im Format 80 x 82 mm.

### 6.1 Gellösungen

<b>4 x Trenngelpuffer</b>	1,5 M Tris/Cl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
<b>4 x Sammelgelpuffer</b>	0,5 M Tris/Cl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
<b>Elektrophoresepuffer</b>	23 mM Tris/Cl 190 mM Glycin 0,2% (w/v) SDS
<b>Probenpuffer</b>	62,5 mM Tris/Cl pH 6,8 25 mM Dithiotreitol (DTT) 10% (w/v) Glycerin 3% (w/v) SDS 0,1% Bromphenolblau

Rotiphorese Gel30 Acrylamidlösung 37,5:1 (30% (w/v) Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid

APS 10% (w/w) in dest. H<sub>2</sub>O (Ammoniumpersulfat)

TEMED 99% p.A. (N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin)

## 6.2 Präparation der Gele und der Elektrophoresekammer

### Trenngel-/Sammelgelmischung:

x ml 30% Acrylamid-Stocklösung

x ml 4 x Trenngel-/Sammelgelpuffer

x ml 10% APS / ml Trenngel-/ Sammelgelmischung

1 µl TEMED / ml Trenngel-/Sammelgelmischung

Für die 1D-Elektrophorese der IF-Proteine wurden 10%ige Polyacrylamidgele im Format 80 x 82 mm und 1 mm Schichtdicke verwendet. Zur Herstellung der Gele wurden zwei Glasplatten (davon eine „Ohrenplatte“, mit einer 2,8 cm tiefen Einbuchtung), jedoch durch zwei 1 mm dicke Abstandshalter getrennt, aufeinander gelegt. Diese wurden an drei Seiten mit Klebeband und zusätzlich von innen mit aufgekochter 0,5%iger Agarose abgedichtet. Nach Erkalten der Agarose wurde die kurz zuvor ange-setzte Trenngelmischung (10% Acrylamid) zwischen die Glasplatten, bis 1,5 cm unter den Rand der Ohrenplatte gegossen und sofort mit Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation (ca. 30 min) wurde die Geloberfläche gründlich mit dest. H<sub>2</sub>O gespült und überschüssige Flüssigkeit mit einem fusselreifen Tuch abgenommen. Die kurz zuvor ange-setzte Sammelgelmischung (3,9% Acrylamid) wurde nun bis direkt unter den Rand der Ohrenplatte blasenfrei auf das Trenngel gegossen. In die noch flüssige Gellösung wurde ein Probenkamm (1 cm Dicke; 12 Taschen) luftblasenfrei eingesetzt und das Gel bis zur vollständigen Polymerisation (ca. 20 min) stehengelassen. Fertige Gele wurden mit feuchten Tüchern umwickelt und in Frischhaltefolie eingeschlagen und konnten so bei 4°C bis zu zwei Wochen aufbewahrt werden.

Für die Elektrophorese wurde der Probenkamm wieder entfernt und die entstehenden Taschen mit dest. H<sub>2</sub>O gründlich gespült. Nach Entfernen der Klebestreifen wurden die Gele in die Elektrophorese-kammer eingespannt und der obere wie der untere Puffertank mit Elektrophoresepuffer gefüllt.

## 6.3 Vorbereitung der Proben

Die Pellets der IF-Präparationen (siehe B 5.2) wurden in einem geeigneten Volumen Laemmli-Proben-puffer (mit DTT anstelle von Mercaptoethanol) aufgenommen, gründlich resuspendiert und bei 95°C für fünf Minuten denaturiert. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und die verbleibenden Überstände in die Geltaschen zentrifugiert. Als Molekulargewichtsmarker diente „SDS-6H“ von Sigma (Deisenhofen).

Das Proteingemisch enthielt folgende Substanzen:

Carboanhydrase	$M_r$	29000
Ovalbumin	$M_r$	45000
Rinderserumalbumin	$M_r$	66000
Phosphorylase b	$M_r$	97400
$\beta$ -Galactosidase	$M_r$	116000
Myosin	$M_r$	205000

## 6.4 Elektrophorese

Nach der Beladung der Geltaschen mit Marker und Probengemisch wurde der obere Puffertank mit der Kathode und das untere Pufferreservoir mit der Anode verbunden. Die Elektrophorese erfolgte mit einem anfänglichen Strom von 15 mA / Gel, nach der Einwanderung der Proteine in das Gel wurde auf 25 mA / Gel gesteigert. In der Regel wurde die SDS-PAGE abgebrochen, wenn die Bromphenolblaufront den unteren Gelrand erreichte.

Die Gele wurden aus der Kammer entnommen und eine der Glasplatten vorsichtig abgehoben. Das Trenngel wurde von dem Sammelgel abgetrennt und entweder mit Coomassie gefärbt oder für einen Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen benutzt. Das Sammelgel wurde verworfen.

## 7. Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) nach den von O'Farrel, 1975 und O'Farrel, 1977 beschriebenen Methoden, wurden die Proteine in der ersten Dimension in einem pH-Gradienten getrennt. Als Elektrophoresekammer diente Phero-vert-180 von Biotec (Reiskirchen). Zwei zugehörige 2D-Riegel dienten zur Aufnahme von je sieben Glasröhrchen (Außen  $\varnothing$  6 mm, Innen  $\varnothing$  3 mm, Länge 130 mm,) für die erste Dimension. In der zweiten Dimension erfolgte, unter denaturierenden Bedingungen, die Auftrennung der Proteine nach ihren relativen Molekülmassen. Dazu wurde die gleiche Kammer, jedoch ohne die 2D-Riegel, benutzt. Die Kammer konnte dann zwei vertikale Gele á 180 x 170 mm aufnehmen.

## 7.1 Die erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung; IEF)

Die Elektrophorese der ersten Dimension erfolgte in Polyacrylamid-Rundgelen. Die Proteine wanderten dabei im elektrischen Feld von der Kathode (mit basischem Puffer) zur Anode (mit saurem Puffer). Durch die Zugabe von Ampholinen (Pharmacia; Upsala; Schweden) zu den Gelen, bildete sich während der Elektrophorese ein stabiler pH-Gradient im Gel. Proteine haben, entsprechend ihrer Aminosäurezusammensetzung, einen definierten pH Wert bei dem ihre Nettoladung fast ganz verschwindet. An diesem isoelektrischen Punkt (IEP = pI) stellten sie ihre Wanderung im elektrischen Feld ein (Fokussierung), es kam zu einer Anreicherung im Gel.

### 7.1.1 Gellösungen

#### Lysis Puffer A

9,5 M Harnstoff  
25 mM DTT  
2% (w/v) Nonidet P-40  
0,8% Ampholine pH 4 - 6  
0,8% Ampholine pH 5 - 7  
0,4% Ampholine pH 3,5 - 10

#### Lysis Puffer K

6 M Harnstoff  
5% (w/v) Nonidet P-40  
0,4% Ampholine pH 4 - 6  
0,4% Ampholine pH 5 - 7  
0,2% Ampholine pH 3,5 - 10

#### 2D-Acrylamid (30% w/v) (28,38:1,62)

28,38 g Acrylamid  
1,62 g Bisacrylamid  
bidest. H<sub>2</sub>O ad 100 ml

#### O-Puffer

60 mM Tris/Cl pH 6,8  
20 mM Dithiotreitol (DTT)  
2% SDS  
10% (w/v) Glycerin

---

<b>Anoden-Elektrophoresepuffer</b>	10 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Kathoden-Elektrophoresepuffer</b>	20 mM NaOH

Nonidet P-40 10% (w/v) in dest. H<sub>2</sub>O (Nonylphenyl-polyethylenglykol)

APS 10% (w/w) in dest. H<sub>2</sub>O (Ammoniumpersulfat)

TEMED 99% p.A. (N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin)

Von Lysis A- und Lysis K-Puffer wurden Aliquots angesetzt, welche bei -20°C gelagert und nach Bedarf aufgetaut wurden. Alle übrigen Lösungen wurden frisch angesetzt. Für einige Auftrennungen wurde ein Lysis A-Probenpuffer mit einer auf 8% (w/v) erhöhten Nonidet-P40-Konzentration verwendet.

### 7.1.2 Präparation der Rundgele

Die Glasröhrchen für die Polyacrylamidrundgele wurden mit Aceton ausgespült und mit Druckluft getrocknet. Anschließend wurde ein Ende mit Parafilm abgedichtet.

#### **Zusammensetzung des Fokussiergels:** (für 10-12 Gele)

5,7 g Harnstoff

1,33 ml 2D-Acrylamidlösung (30%)

2 ml Nonidet-P40 10%

2 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

0,2 ml Ampholine pH 4-6

0,2 ml Ampholine pH 5-7

0,1 ml Ampholine pH 3,5 -10

10µl APS 10%

7 µl TEMED

Die Acrylamidlösung wird zusammen mit Nonidet P-40 und H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> vorsichtig erwärmt (ca. 40 °C) und der Harnstoff darin gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurden die hitzeempfindlichen Ampholine, APS und TEMED zugesetzt. Die fertige Gellösung wird nach vorsichtigem, aber gründlichen Mischen mit einer langen Pasteurpipette bis ca. 1 cm unter den Rand in die Glasröhrchen gefüllt. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden durch vorsichtiges Klopfen entfernt. Die Rundgele wurden mit destilliertem Wasser überschichtet und mit Parafilm versiegelt. Bis zum Ende der Polymerisation (3-4 h oder über Nacht) wurden die Gele senkrecht im Dunkeln aufgestellt. Die so präparierten Gele waren im Dunkeln bis zu acht Tage haltbar.

### 7.1.3 Vorbereitung der Proben und der Elektrophoresekammer

Die fertig polymerisierten Gele wurden gründlich mit destilliertem Wasser abgespült und der Parafilm entfernt. Mit Hilfe einer Spritze wurden die Gele von der Oberseite her ein kleines Stück aus dem Gel herausgedrückt und das hervorstehende Gelstück mit einem Skalpell entfernt. Über diese Unterseite wurde ein Stück Gaze gestreift und mit einem Gummiband fixiert. Die so präparierten Gele wurden in den 2D-Riegel eingesetzt und in die Elektrophoresekammer eingespannt.

Die Pellets der IF-Präparationen (siehe B 5.2) wurden unter Zugabe einiger Kristalle Harnstoff in einem geeigneten Volumen Lysis A Puffer aufgenommen, gründlich resuspendiert und anschließend kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde aufgenommen und mit folgenden Markerproteinen (ca. 2 – 3 µg / Rundgel) versetzt:

	<b>Mr</b>	<b>pI</b>
Rinderserumalbumin	66000	6,1
Aktin aus Kaninchenmuskel	42000	5,4

Die so behandelten Proben wurden luftblasenfrei auf die Rundgele aufgetragen und vorsichtig mit 20 µl Lysis K überschichtet. Abschließend wurde mit Kathoden-Elektrophoresepuffer bis zum oberen Glasrand aufgefüllt.

### 7.1.4 Elektrophorese und Weiterbehandlung der Rundgele

Die Glasröhrchen wurden bis zum oberen Rand in den 2D-Riegel eingeschoben und der Rand mit aufgekochter 0,5%iger Agaroselösung abgedichtet. Anschließend wurde der obere Puffertank mit Kathoden- und der untere mit Anoden-Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Es erfolgte keine Vorelektrophorese, die Einstellung des pH-Gradienten erfolgte direkt mit der Elektrophorese der Proben, über eine schrittweise Steigerung der angelegten Spannung. Es wurde mit 200 V für 30 min begonnen und dann auf 300V für 15 min gesteigert. Danach erfolgte die Fokussierung für 16-18 h bei konstanten 400 V.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einer Spritze aus den Glasröhrchen herausgedrückt und in einem Kunststoffschälchen in O-Puffer für 20 min äquilibriert. Dabei wurde die Orientierung der Rundgele (saurer bzw. basisches Ende) notiert. Der O-Puffer wurde vorsichtig abgegossen und die Gele entweder direkt auf die Flachgele der zweiten Dimension aufgetragen oder zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

## 7.2 Die zweite Dimension (SDS-PAGE)

Die für die zweite Dimension verwendeten Gele hatten die gleiche Zusammensetzung wie die Gele der 1D-PAGE (siehe B 6.) und wurden auf ähnliche Weise behandelt. Die verwendeten Glasplatten waren mit den Maßen 170 x 180 mm jedoch größer, der Abstandshalter mit 1,5 cm dicker. Die Ohrenplatten wiesen an den oberen Kanten einen zur Gelseite zeigenden schrägen Schliff auf, der zur Aufnahme der Rundgele diente. Das Sammelgel wurde direkt bis an diesen Schliff herangegossen, ein Probenkamm wurde nicht eingesetzt. Nach dem Gießen wurde das Sammelgel direkt mit destilliertem H<sub>2</sub>O überschichtet.

Für die Elektrophorese wurde das Klebeband entfernt und das Sammelgel gründlich mit destilliertem Wasser abgespült. Nach dem Einspannen der Gelplatten in die Kammer wurde jeweils ein äquilibriertes Rundgel pro Gelplatte auf den Schliff gelegt. Die Rundgele wurden dabei so orientiert, daß die saure Seite stets rechts lag. Mit Hilfe aufgekochter 1%iger Agarose in O-Puffer wurde das Rundgel mit dem Sammelgel blasenfrei verbunden. Die Agarose-O-Puffer-Lösung enthielt außerdem noch Bromphenolblau als Farbmarder. Die beiden Puffertanks wurden mit den entsprechenden Puffern befüllt und die Kammer an das Netzgerät angeschlossen. Die Elektrophorese erfolgte mit einem anfänglichen Strom von 20 mA / Gel, nach der Einwanderung der Proteine in das Gel (ca. 35 min) wurde auf 40 mA / Gel gesteigert. Sobald die Bromphenolblaufront das untere Gelende erreicht hatte wurde die Elektrophorese abgebrochen. Die Gele wurden aus der Kammer entnommen und eine der Glasplatten vorsichtig abgehoben. Das Trenngel wurde von dem Sammelgel abgetrennt und entweder mit Coomassie gefärbt oder für einen Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen benutzt. Das Sammelgel wurde verworfen.

## 7.3 Färben der Proteine im Gel

<b>Färbelösung</b>	0,1% Coomassie Brilliant Blue R250 7,5% Essigsäure 40% Ethanol
<b>Entfärbelösung</b>	20% Isopropanol 7,5% Essigsäure



## 8.2 Reversible Färbung der Proteine mit Ponceau S

Nach dem Transfer wurden die Membranen kurz in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für 10 min in 1:10 verdünnter Ponceau S-Lösung (Sigma, Deisenhofen) gefärbt. Durch vorsichtiges Waschen in dest. H<sub>2</sub>O wurde der Hintergrund entfernt. Die Membranen wurden getrocknet und auf einen minimalen Rand zurechtgeschnitten. Auf einer Leuchtplatte (Rex, Erlangen) wurden im Durchlicht mit einem „Video Copy Processor“ (Mitsubishi) Videoausdrucke angefertigt. Zusätzlich wurden die Proteinmuster und die Membranbegrenzungen zur späteren Zuordnung von Positivreaktionen auf Transparentfolie abgezeichnet. Die Blots wurden trocken zwischen Whatman® 3MM Papieren aufbewahrt oder direkt weiterverwendet.

## 9. Identifizierung von Typ I und Typ II Keratinen

Keratine bilden obligat Heterodimere mit einem Partnermolekül des anderen Typs. Während *in vivo* nur bestimmte Paarungen auftreten, können sich *in vitro* beliebige Kombinationen bilden. Beim Complementärer-Keratin-Blot-Bindungs-Test (CKBB-Test) können auf Nitrocellulose immobilisierte Keratine identifiziert und den Typen I beziehungsweise II zugeordnet werden. Zur Identifizierung von Typ I-Keratinen wurden die Membranen mit biotinyliertem humanem Keratin 8 (Typ II) inkubiert. Umgekehrt wurde zur Identifizierung von Typ II-Keratinen biotinyliertes humanes Keratin 18 (Typ I) verwendet. Die rekombinanten humanen Keratine wurden freundlicherweise von Dr. H. Herrmann (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Diese Arbeiten wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Frau Nicole Tappe durchgeführt.

### 9.1 Biotinylierung von Proteinen

**BNHS**            1 mg/ml (Biotinyl-N-hydroxysuccinimid in Dimethylformamid)

**TBS**             20 mM Tris/Cl pH 7,6

                     137 mM NaCl

Die zu markierenden Proteine wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml verdünnt in TBS eingesetzt. Je Milliliter Proteinlösung wurden 50 µl BNHS-Lösung zugesetzt und gründlich gemischt. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde überschüssiges BNHS mittels Dialyse entfernt. Die Reinigung erfolgte unter ständigem Rühren über Nacht bei 8°C gegen TBS. Der Dialyseschlauch (Visking; Roth, Karlsruhe) wurde vor Gebrauch 5 min ausgekocht. Das so markierte Protein wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

## 9.2 Komplementärer Keratin-Blot-Bindungs-Test (CKBB-Test)

### 9.2.1 Lösungen

<b>Bindungspuffer</b>	4 M Harnstoff 10 mM Tris pH 8,0 3% BSA 0,1% Tween <sup>®</sup> 20
<b>Hochsalzextraktionspuffer</b>	1,5 M NaCl 10 mM Tris/Cl pH 8,0 30 mM KCl 0,5% Triton <sup>®</sup> X-100 0,1% Tween <sup>®</sup> 20
<b>TBST</b> (“Tris buffered saline and Tween <sup>®</sup> ”)	10 mM Tris/Cl pH 8,0 140 mM NaCl 0,1% Tween <sup>®</sup> 20

### 9.2.2 Inkubation der Membranen

Die zu identifizierenden Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (siehe B 8.). Zur Renaturierung der Proteine und zum Blocken der Oberfläche wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in TBST geschüttelt. Für die Inkubationslösung wurde 15-30 µg biotinyliertes Protein in 2-3 ml Bindungspuffer gelöst. Je eine Membran wurde zusammen mit 2-3 ml in Folie eingeschweißt und auf einem Drehbrett (Eigenbau der Feinmechanischen Werkstatt, Universität Mainz) über Nacht bei 8°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 4-6x für 10-15 min bei Raumtemperatur in Hochsalzextraktionspuffer gewaschen. Die gebundenen biotinmarkierten Proteine wurden mit Streptavidin detektiert, wie im folgenden Kapitel beschrieben.

## 9.3 Biotin/Streptavidin-Nachweis von Proteinen

Die Membranen wurden für 1 h mit 10% Milchpulver in TBST blockiert. Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Promega, Mannheim) wurde 1:5000 zu einer Lösung von 5% Milchpulver in TBST zugesetzt und damit die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten vier Waschungen für jeweils 15 min in TBST. Abschließend wurde die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase durchgeführt (siehe B 11.).



## 11. Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase setzt die beiden Substrate NBT und BCIP zu einem blau-violettem Farbstoff um. Dieser ist schwer löslich und schlägt sich daher leicht nieder. Es entsteht ein blau-violetter Niederschlag, der zumeist mit dem bloßen Auge sichtbar ist.

### 11.1 Lösungen

AP-Puffer	100 mM Tris/Cl pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Substrat NBT	50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid (NBT = p-Nitrobluetetrazoliumchlorid)
Substrat BCIP	50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid (BCIP = 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz)

### 11.2 Farbreaktion

Kurz vor Gebrauch wurde eine Substratlösung von 3,3 µl BCIP und 6,6 µl NBT pro ml AP-Puffer angesetzt. Die Membranen wurden kurz in AP-Puffer äquilibriert, abgetropft, mit der Substratlösung versetzt und anschließend ruhig und lichtgeschützt stehengelassen. Je nach Intensität der Reaktion wurde die Farbentwicklung nach 1- 240 min durch Zugabe von reichlich Wasser abgestoppt.

## 12. Foto-Dokumentation

Endgültig mit Comassie Brilliant Blue gefärbte Trenngele oder Membranen des CKBB-Test oder der Immunoblots wurden auf eine Leuchtplatte (Rex, Erlangen) gelegt und mit einem Gelbfilter im Durchlicht fotografiert (Blende 8, Belichtungszeiten: 1/2, 1/4, 1/16 und 1/32 sec). Als Film wurde Agfa Pan 25 verwendet, der in Rodinal (beide Agfa-Gevaert, Leverkusen) Verdünnung 1:25,5 entwickelt wurde. Von geeigneten Objekten wurden auch Bilder mit einer Digitalkamera (Olympus C 1400 XL) aufgenommen. Für Makroaufnahmen diente eine spezielle Linse („macro conversion lens“ f=40 cm), ebenfalls von Olympus.

## 13. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

### 13.1 Anfertigung und Fixierung von Gewebeschnitten

Von den in Isopentan eingefrorenen Geweben (siehe B 3.2) wurden mit einem Gefriermikrotom (HM 500 OM, Fa. Microm, Walldorf) 5  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte angefertigt. Dabei betrug die Boxentemperatur  $-30^{\circ}\text{C}$  und die Objekttemperatur je nach Gewebe zwischen  $-29^{\circ}\text{C}$  und  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die Schnitte wurden auf mit Petrolbenzin gereinigte Glasobjektträger überführt und anschließend mindestens eine Stunde oder über Nacht, vor Staub geschützt, luftgetrocknet. Danach wurden die Gefrierschnitte 10 min mit eiskaltem Aceton ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) fixiert und luftgetrocknet.

### 13.2 Antikörperinkubation und Einbetten der Gewebeschnitte

PBS ("Phosphate Buffered Saline")	140 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
	1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden, wurden alle Antikörper-Inkubationen in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 13.2.1 Herstellung des Einbettmediums

Als Einbettmedium wurde eine Polyvinylalkohol-Lösung verwendet. Dazu wurde der pH Wert des PBS-Puffers auf 8,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 20 g Mowiol<sup>®</sup> 4-88 (Calbiochem, La Jolla, USA) unter Rühren ca. 24 h bei Raumtemperatur in 80 ml PBS gelöst. Im Folgenden wurden 40 ml wasserfreies Glycerin (Glycerol 99%, Serva, Heidelberg) zugesetzt und über Nacht gerührt. Das Gemisch wurde anschließend für 15 min bei Raumtemperatur mit 12000 Upm (Sorvall, Rotor SS34) zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zum Gebrauch eingefroren. Einmal aufgetaute Aliquots wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **13.2.2 Inkubation mit dem primären Antikörper**

Als primäre Antikörper wurden die in Kapitel B 4. angegebenen verwendet. Monoklonal Antikörper wurden als Medienüberstand pur oder 1:10 verdünnt eingesetzt, polyklonale wurden 1:100 in PBS verdünnt. Käufliche Antikörper wurden entsprechend den Herstellerangaben mit PBS verdünnt. 15-25 µl der Antikörperlösung wurde gleichmäßig über den Gefrierschnitt verteilt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden ungebundene Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt (3 x 5 min).

### **13.2.3 Inkubation mit dem sekundären Antikörper**

Es wurden Ziege-anti-Maus- beziehungsweise Ziege-anti-Meerschweinchen-Antikörper (Dianova, Hamburg) verwendet, an welche der Fluoreszenzfarbstoff Texas Red gekoppelt war. Diese wurden 1:200 in PBS verdünnt eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden ungebundene Antikörper durch Waschen mit PBS (3 x 5 min) entfernt. Anschließend wurde zur Entfernung von Salzen 2 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Durch Einlegen in absoluten Alkohol für 5 min wurden die Schnitte dehydratisiert. Nach abschließender Lufttrocknung wurden die Proben in Mowiol® eingebettet. Die Herstellung des Einbettmediums Elvanol erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern, erfolgte die Lagerung der Präparate lichtgeschützt in Mappen.

## **13.3 Mikroskopieren und Fotografieren**

Es wurde das Epifluoreszenzmikroskop Leitz DM/RBD (Leica, Wetzlar) verwendet. Als UV-Lichtquelle diente eine Quecksilberhöchstdrucklampe (HB050) vom Typ L1. Die Phasenkontrast- / und Fluoreszenzaufnahmen wurden mit den Objektiven PL Fluotar, 10x / 0,30, 40x / 0,70, 40x / 1,0 (Ölimmersion) und PL APO 63x / 1,32 (Ölimmersion) durchgeführt (Okular 10-25fach). Es wurde mit Kodak TMax 400 Filmen fotografiert, die mit dem zugehörigen Kodak TMax Entwickler entwickelt wurden.

## 14. Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 14.1 Medien und Agarplatten

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

Alle Medien wurden zügig nach der Herstellung autoklaviert (1 bar Überdruck, 120°C, 30 min). Zur Herstellung von Agar-Platten wurden die Agar-Medien-Lösungen auf 55°C abgekühlt und die Petri-schale damit etwa zur Hälfte befüllt:

Ø kleine Platten: 85 mm

Ø große Platten: 145 mm

Zur selektiven Anzucht bestimmter resistenter Bakterienstämme oder Transformanten wurden den (Agar-) Medien Antibiotika zugesetzt. Da diese Wachstumsinhibitoren temperatursensitiv sind, erfolgte die Zugabe erst nach Abkühlung auf  $<55^{\circ}\text{C}$ . Es wurden folgende Endkonzentrationen verwendet:

Tetracyclin	50 $\mu\text{g}$ / mL
Ampicillin	100 $\mu\text{g}$ / mL
Kanamycin	12,5 $\mu\text{g}$ / mL

## 14.2 Bakterienstämme, Phagen und Vektoren

### Bakterienstämme

*E. coli* XL1-blue MRF<sup>'</sup> (Stratagene, Heidelberg)

*E. coli* XL0LR (Stratagene, Heidelberg)

### Phagen

$\lambda$ -Phage (Stratagene, Heidelberg)

Ex Assist<sup>TM</sup> Helper Phage (Stratagene, Heidelberg)

### Vektoren

ZAP Express<sup>®</sup> Vektor (Stratagene, Heidelberg)

pBK-CMV (Stratagene, Heidelberg)

## 14.3 Bakterienkulturen

### • Glycerinkultur

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterien wurden diese als Lösung mit einem Glyceringehalt von 20-50% bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dazu wurden 750  $\mu\text{l}$  einer Übernachtskultur der betreffenden Bakterien mit 600  $\mu\text{l}$  Glycerin p.A. versetzt und aliquotiert.

### • Flüssig- / Übernachtskultur

Zur Herstellung einer Flüssigkultur eines Bakterienklones wurde die entsprechende Einzelkolonie mit Hilfe einer ausgeglühten Impföse oder einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur in 3 ml des geeigneten Kulturmediums überführt und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Schüttler (220 Upm) inkubiert.

- **Plattenkultur**

Zur Herstellung von Plattenkulturen wurden Bakterien einer Übernacht- oder einer Glycerinkultur mit einem sterilen Zahnstocher oder einer ausgeglühten Impföse auf geeignete Agar-Platten übertragen und bei 37°C über Nacht inkubiert. So erhaltene Plattenkulturen konnten luftdicht verschlossen bei 8°C 3-4 Wochen aufbewahrt werden.

- **MgSO<sub>4</sub>-Kultur von Bakterienstämmen**

Bakterien einer Platten- bzw. einer Glycerinkultur wurden mit Hilfe von Einweg-Impfösen in ein Nährmedium aus 30 ml LB-Medium, 0,2% (w/v) Maltose, 10 mM MgSO<sub>4</sub> und Tetracyclin (50 µg/ml) übertragen. Diese Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator (200 Upm) bis zu einem Extinktionswert größer eins (bei 600 nm) wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur 10 min bei 2400 Upm (~1000 g) und 4°C in der Heraeus-Zentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde mit einem halben Volumen der Ausgangsmenge in 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und die optische Dichte (OD) in einem Spektrophotometer (Ultraspec<sup>®</sup> Plus; Pharmacia, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) gemessen. Als Referenz diente bakterienfreies MgSO<sub>4</sub>. Ein OD<sub>600</sub>-Wert von 1 entsprach dabei ~8 x 10<sup>8</sup> *E. coli*-Bakterien. Die Suspensionen konnten dann für mindestens 48 h bei 4°C gelagert werden.

- **Kompetente Bakterien**

Um Plasmide klonieren zu können, mußten diese in Bakterien transformiert werden. Hierzu wurden die Bakterien einer Magnesium/Calciumchlorid-Behandlung unterzogen. Dabei quollen sie durch Destabilisierung der Membran auf, ein gewisser Prozentsatz konnte dann das gewünschte Plasmide aufnehmen. Bakterien einer Übernachtskultur wurden 1:100 mit 20-40 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C im Schüttler (220 Upm) inkubiert. Nach etwa 4 h wurde eine OD<sub>600</sub> von 0,2-0,4 erreicht. Durch diesen Schritt befanden sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase, in der sie besonders gut aufnahmefähig gemacht werden konnten. Nach Zentrifugation (Sorvall, Rotor SS34; 5000 Upm, 4°C, 5 min) wurde das Pellet in 20 ml 0,1 M eiskaltem MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und wie oben angegeben erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Die so behandelten Bakterien konnten bei 4°C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

## 15. Nucleinsäure-Präparationen

### 15.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe

**GTC-Puffer**                      4 M Guanidin Thiocyanat  
   25 mM Na-Citrat  
   20 mM DTT (Dithiotreitol)  
   pH 7, mit 1 M NaOH eingestellt  
   sterilfiltriert, bei 4°C gelagert

**CIA**                                Chloroform / Isoamylalkohol (49:1)  
Natriumacetat 2 M, pH 4  
Saures Phenol, wassergesättigt  
LiCl 8M

Die während der Präparation des Tieres gewonnenen Gewebehomogenisate (siehe B 3.2) wurden bei -80°C in 50 ml Falcons aufbewahrt. Diese Lösungen wurden im 37°C Wasserbad zügig aufgetaut und pro Falcon mit 1 ml 2 M Na-Acetat versetzt und gründlich gemischt. Es erfolgte die Zugabe von 10 ml saurem Phenol und gründliches vortexen. Nach Zugabe von 10 ml CIA und erneutem Mischen wurde der Ansatz für 10 min ruhig auf Eis stengelassen. In der auf 4°C vorgekühlten Heraeus-Zentrifuge wurde die Probe mit 6000 Upm für 50 min zentrifugiert. Die entstandene obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches 50 ml Falcon gegeben. Nach Zugabe von 1 Volumen eiskaltem Isopropanol und gründlichem Mischen wurden die Nucleinsäuren für mindestens 1 h bei -20°C präzipitiert. Anschließend folgte eine erneute Zentrifugation für 50 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml GTC-Puffer gelöst. Nach erneuter Zugabe eines Volumen Isopropanols wurde für mindestens 30 min bei -20°C präzipitiert. Der bei der anschließenden Zentrifugation (6000 Upm; 4°C 30 min) anfallende Überstand wurde sorgfältig abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde mit eiskaltem 80% Ethanol vorsichtig gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet zum Trocknen bei Raumtemperatur stengelassen, bis der Alkoholgeruch vollständig verschwunden war. Zum Lösen des Sediments wurden 5-10 ml bidestilliertes H<sub>2</sub>O zugesetzt und nach Bedarf bis auf maximal 55°C erwärmt. Wenn das Pellet vollständig gelöst war, wurde für 30 min bei 6000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Nucleinsäuren befanden sich danach im Überstand.

Zur direkten Aufreinigung der RNA und Entfernung von DNA wurde die Lösung mit einem Volumen 8 M LiCl versetzt und über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde für 50 min bei 6000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 70% Ethanol

gewaschen. Die Lösung wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, bis der Alkohol sich verflüchtigt hatte. Anschließend wurde das Pellet mit 500  $\mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser aufgenommen und eine Reinheitsbestimmung durchgeführt. Die RNA wurde nur in gefälltem Zustand aufbewahrt (siehe B 15.3).

## 15.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nucleinsäuren

Zur schnellen Abschätzung der DNA-Konzentration wässriger Lösungen konnte ein 1%iges Agarose-Gel (siehe B 21. ) in einer Petrischale („Dot-Test“) verwendet werden. Jeweils 1  $\mu\text{l}$  einer Reihe von DNA-Lösungen bekannter Konzentrationen und 1  $\mu\text{l}$  der zu schätzenden Probe wurden auf das Gel aufgebracht. Nach 10 min Inkubation konnte das Gel im UV-Durchlicht betrachtet und die DNA-Menge im Vergleich zur Eichreihe abgeschätzt werden.

Genauer konnte die Konzentration von Nucleinsäuren photometrisch bestimmt werden (Bio-Photometer; Eppendorf, Hamburg). Dazu wurde die Optische Dichte bei 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ) ermittelt. Jeweils eine Einheit entsprach dabei:

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

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

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

Zur Bestimmung der Reinheit von Nucleinsäuren wurde der Quotient aus  $\text{OD}_{260}$  und  $\text{OD}_{280}$  ermittelt. Der Wert sollte für reine DNA-Lösungen bei 1,8 und für reine RNA-Lösungen bei 2,0 liegen. Werte unter 1,8 deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin.

## 15.3 Fällung und Reinigung von Nucleinsäuren

Zum Fällern und Aufreinigen von RNA/DNA wurde die entsprechende Lösung mit 1/10 Volumen 2 M Na-Acetat versetzt und gemischt. Nach Zugabe des 2,5fachen Volumen eiskaltem 100% (v/v) Ethanol wurde über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt oder gelagert. Zur Wiedergewinnung der RNA/DNA wurden die Lösungen für 30 min bei 6000 Upm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde zur Entfernung von Salzen zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet, bis der Alkohol sich verflüchtigt hatte. Danach wurde die RNA/DNA in einem geeigneten Volumen bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.



<b>Beladungspuffer 10x</b>	50% Glycerol 0,4% Bromphenolblau 1 mM EDTA pH 8
<b>Laufpuffer</b>	1x MOPS
<b>Ethidiumbromid-Stammlösung</b>	10 mg /ml

### 15.5.2 Vorbereiten der Proben

6 µl RNA-Lösung

12 µl Formamid

2,5 µl 10x MOPS

4 µl Formaldehyd 37%

Der Ansatz wurde für 5 min bei 70 °C denaturiert und dann auf Eiswasser abgekühlt.

+ 2µl Beladungspuffer

+ 0,5 µl Ethidiumbromid, direkt in die Proben tasche gegeben

Wurde mehr oder weniger RNA-Lösung eingesetzt, wurden die Mengen der anderen Lösungen angepaßt!

### 15.5.3 Herstellen des Geles und Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte in der horizontalen Minigelkammer von Biotech Fischer (Reiskirchen). Vor der Benutzung wurden Gelkammer, Probenkamm etc. gründlich mit 0,5 M NaOH gereinigt und mit DEPC (siehe B 2.) behandeltem bidest. H<sub>2</sub>O abgespült. Danach wurde der Gelschlitten an der Ober- und Unterseite mit Riegeln und zusätzlich mit Tesafilm<sup>®</sup> abgedichtet und ein Probenkamm eingesetzt. 0,4 g Agarose wurde in 4 ml 10x MOPS und 30 ml bidest. H<sub>2</sub>O aufgekocht. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden 6,8 ml 37% Formaldehyd-Lösung zugesetzt und das Gel unter dem Abzug gegossen. Nach Verfestigung der Agarose wurden die Abdichtungen und der Probenkamm entfernt, der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer gesetzt und soviel Elektrophoresepuffer eingefüllt, bis das Gel bedeckt war. Die präparierten Proben wurden in die Taschen pipettiert und mit einer konstanten Spannung zwischen 100-150 V aufgetrennt. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel im UV-Licht betrachtet und mit einem „Video-Copy-Processor“ (Mitsubishi) dokumentiert.

Falls die Färbung mit Ethidiumbromid unzureichend war, bestand die Möglichkeit das Gel für 3 min mit 0,5% Toluidinblau in Wasser nachzufärben.

## 15.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der PCR (**P**olymerase-**K**etten-**R**eaktion; **p**olymerase **c**hain **r**eaction) wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen, DNA zu duplizieren, genutzt. Voraussetzung hierfür ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH Ende, welches dann verlängert werden kann. Dieser doppelsträngige Abschnitt kann künstlich erzeugt werden. Die DNA, die das zu vermehrende Stück (Zielsequenz) trägt, das sogenannte Template (oder auch Matrize), wird durch Erhitzen auf 94°C denaturiert, d. h. in die beiden komplementären Einzelstränge getrennt. Ein zugesetztes Oligonucleotid (18-30 Basen, der „Primer“) bindet an den zu amplifizierenden Einzelstrang („Annealing“). Von dort aus kann die Polymerase den Strang verlängern („Elongation“). Im folgenden Schritt wird die nun doppelsträngige DNA durch Temperaturerhöhung wieder einzelsträngig (Denaturierung) und der Prozeß kann sich wiederholen. Verwendet man gleichzeitig zwei Primer, von denen einer („upstream“) am „sense“-Strang und der andere („downstream“) am „antisense“-Strang (Gegenstrang) bindet, wird der dazwischen liegende Bereich bei jedem Zyklus verdoppelt. Die Anzahl der synthetisierten Zielsequenz-DNA zwischen den beiden Primern nimmt dadurch exponentiell zu, unter der Voraussetzung, daß es zu keiner Limitierung durch die Anzahl frei verfügbarer Nukleotide, Primer oder nachlassender Polymeraseaktivität kommt. Die DNA-Polymerase des hitzestabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase) übersteht mehr als 30 Denaturierungsschritte und hat ihr Temperaturoptimum bei 68°C bis 72°C. Die Schmelztemperatur lag bei den gewählten Oligonucleotiden je nach G/C-Gehalt und Anzahl der Basen zwischen 45°C und 65°C. Alle verwendeten Primer wurden bei den Firmen Roth (Karlsruhe), GENAXIS Biotechnology GmbH (Spechbach) und bei GenTech Mainz (Prof. Dr. Hennig, Physiologische Chemie, Universität Mainz) bezogen. Die Primer wurden in bidest. H<sub>2</sub>O zu einer Konzentration von 100 pmol/µl resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Alle PCRs wurden in Thermocyclern der Firmen Biometra<sup>®</sup> (TGradient), MJ Research (Minicycler<sup>™</sup>) und Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) durchgeführt.

### 15.6.1 PCRs mit RNA

Neben der „klassischen“ PCR zur Herstellung von digoxigenin-markierten DNA-Sonden (siehe B17.2.2) wurden noch zahlreiche RT-PCRs und 3'-RACE-PCRs durchgeführt. Bei diesen Varianten der PCR wird RNA als Template verwendet. Dazu wird die RNA in einem der eigentlichen PCR vorgeschalteten Schritt von einem Enzym, der *Reversen Transkriptase* (RT), in die stabilere cDNA umgeschrieben. Dieser Schritt entspricht der Erststrangsynthese von cDNA-Banken. Die dabei als Synthesestarter verwendeten Primer sind zur RNA revers komplementär. Zum Einsatz kamen neben Poly-d(T)<sub>n</sub> Oligonucleotide auch sequenzspezifische Primer. Während bei ersteren (fast) das gesamte Spektrum an mRNA umgeschrieben wird, erlauben letztere die spezifische Transkription bestimmter

Sequenzbereiche. Die 3'-RACE-PCR stellt eine Variante der RT-PCR dar. Sie ermöglicht durch die Verwendung von sogenannten „Anker“-Primer die Amplifikation von cDNA-Strängen deren 3'-Ende unbekannt ist.

Neben frei zusammengestellten Komponenten kamen auch folgende Kits zum Einsatz:

“OneStep RT-PCR Kit“, Quiagen® (Hilden)

“3'-RACE-System for Rapid Amplification of cDNA ends” von Invitrogen™

Da die in diesem Abschnitt beschriebenen Verfahren zu keinem verwertbaren Ergebnis führten, wird auf eine weiterführende Beschreibung an dieser Stelle verzichtet. Sie sind hier nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

## 16. Herstellung einer cDNA-Expressionsbibliothek

Die aus den Geweben gewonnene mRNA kann verwendet werden, um die in der Zelle exprimierten Proteine zu identifizieren. RNA reagiert jedoch sehr anfällig auf den Angriff durch RNAsen, ist weniger stabil als DNA und läßt sich schwerer amplifizieren. Sie ist daher für den dauerhaften Einsatz im Labor schlechter geeignet als DNA. Um diesem Problem zu begegnen kann man die gewonnene mRNA in komplementäre cDNA umschreiben. Diese kann dann, eingebunden in Vektoren und verpackt in Phagen, stabil und dauerhaft aufbewahrt werden. Eine cDNA-Bank stellt also im Idealfall ein Abbild der zur Zeit der Präparation exprimierten mRNA oder Proteine dar. Für die Erstellung einer cDNA-Expressionsbibliothek wurden das „ZAP-Express® cDNA Synthesis Kit“ und das „ZAP Express® cDNA Gigapack® III Gold Cloning Kit“ von Stratagene (Heidelberg) verwendet.

Soweit nicht anderweitig beschrieben, erfolgten alle Schritte und Zentrifugationen bei Raumtemperatur (RT). Alle Komponenten wurden erst kurz vor Gebrauch zügig aufgetaut, gründlich gemischt, anzentrifugiert und dann auf Eis gelagert. Alle Reaktionsansätze wurden soweit nicht anders angegeben ebenfalls gründlich gemischt und anzentrifugiert. Von der Anleitung des Herstellers wurde an einigen Stellen, die weiter unten angegeben sind, abgewichen. Auf eine Kontrolle der Reaktionen mit radioaktiv markierten Nucleotiden wurde verzichtet.

### 16.1 Erststrangsynthese

Bei der Erststrangsynthese bindet ein Primer an das Poly(A)<sup>+</sup>-Ende der mRNA. Von diesem Primer aus synthetisiert die Reverse Transkriptase einen methylierten DNA-Strang. Die Anwesenheit eines RNase-Blockers soll die empfindliche RNA schützen. Für die Reaktion wurden 5 µg mRNA benötigt

und das Gesamtvolumen sollte 50  $\mu\text{l}$  betragen. Aus dem RNA-Gel (siehe B 15.5) war bekannt, daß 1  $\mu\text{l}$  der mRNA-Extraktion (siehe B 15.4) 1  $\mu\text{g}$  mRNA enthält. Es wurden daher 5  $\mu\text{l}$  mRNA-Lösung und 32,75  $\mu\text{l}$  Wasser eingesetzt. Da das vorhandene Kit unvollständig war, mußte als Reverse Transkriptase Superscript II (200 U/ $\mu\text{l}$ ) von Invitrogen (Karlsruhe) (mit einem Volumen von 1,25  $\mu\text{l}$ ) verwendet werden. Es wurde keine Kontrollreaktion angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt behandelt:

- 5  $\mu\text{l}$  10x Erst-Strang-Puffer
- 3  $\mu\text{l}$  Erst-Strang-Methyl-dNTP-Mix
- 2  $\mu\text{l}$  Linker-Primer (1,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
- 32,75  $\mu\text{l}$  DEPC behandeltes  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- 1  $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )
- mischen, kurz anzentrifugieren
- 5  $\mu\text{l}$  mRNA (Poly(A)+ RNA)
- vorsichtig mischen, kurz anzentrifugieren
- 10 min bei Raumtemperatur inkubieren (Anlagerung des Primers an die Vorlage)
- 1,25  $\mu\text{l}$  Superscript II (200 U/ $\mu\text{l}$ )
- vorsichtig mischen, sehr kurz anzentrifugieren
- Inkubation für 60 min bei 37°C

## 16.2 Zweitstrangsynthese

Bei der Zweitstrangsynthese wird der noch vorhandene RNA-Strang langsam durch eine RNase abgebaut. Ausgehend von den entstehenden mRNA-Bruchstücken synthetisiert eine DNA-Polymerase den Zweitstrang. Dabei ist es wichtig, daß die Temperatur zur Vermeidung von „Hairpins“ 16°C nicht übersteigt. Daher wurde die Reaktion in einem beheizten Wasserbad im Kühlraum bei 15,8°C durchgeführt. Im Ansatz wurden 2  $\mu\text{l}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dNTP durch 2  $\mu\text{l}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  ersetzt.

## 16.3 Auffüllen der cDNA-Enden („Blunting“)

In diesem Schritt wurden die ungleich langen Enden der cDNA so bearbeitet, daß gleichlange Stränge entstanden. Dem Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten zugesetzt:

- 23  $\mu\text{l}$  blunting dNTP-Mix
- 2  $\mu\text{l}$  *Pfu* DNA-Polymerase (2,5 U/ $\mu\text{l}$ )

Der Ansatz wurde exakt 30 min bei 72 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200 µl gepuffertes Phenol-Chloroform [1:1 (v/v) pH 7-8) zugesetzt und gründlich gemischt. Der Ansatz wurde für 2 min zentrifugiert, dann die obere Phase (mit der DNA) entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe des gleichen Volumens Chloroform und gründlichem Mischen wurde erneut für 2 min abzentrifugiert. Abermals wurde die obere Phase abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat und 400 µl 100% (v/v) Ethanol wurde die DNA dann über Nacht bei -20°C gefällt. Der Fällungsansatz wurde für 60 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Durch Zugabe von 500 µl 70% (v/v) Ethanol wurde das Pellet vorsichtig gewaschen und anschließend für 30 min luftgetrocknet.

#### 16.4 Ligation der *EcoR* I-Adapter

Das getrocknete Sediment wurde für 1 h bei 4°C in 9 µl *EcoR* I Adapter gelöst.

Es wurde

- 1 µl 10x Ligase Puffer
- 1 µl 10 mM rATP
- 1 µl T4 DNA-Ligase (4U/µl)

zugesetzt und für 48 h bei 4°C ligiert. Nach der Reaktion wurde die Ligase durch Erhitzen im Wasserbad für 30 min auf 70°C inaktiviert.

#### 16.5 Phosphorylierung der *EcoR* I Enden

Nach der Hitzeinaktivierung der Ligase wurde der Ansatz kurz anzentrifugiert und dann für 5 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden folgende Reagenzien zugesetzt:

- 1 µl 10x Ligase Puffer
- 2 µl 10 mM rATP
- 6 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- 1 µl T4 Polynucleotid Kinase (10 U/µl)

Die Phosphorylierung fand für 30 min im 37°C Wasserbad statt. Zur Inaktivierung der Kinase wurde für 30 min bei 70°C inkubiert. Der Niederschlag wurde kurz abzentrifugiert und die Probe für 5 min auf Raumtemperatur abgekühlt.

## 16.6 Verdau mit *Xho* I

Dem abgekühltem Ansatz wurden 28  $\mu$ l *Xho* I Puffer-Supplement und 3  $\mu$ l *Xho* I (40 U/ $\mu$ l) zugesetzt und anschließend für 1,5 h bei 37°C verdaut. Zum Ausfällen der DNA wurden danach 5  $\mu$ l 10x STE Puffer und 125  $\mu$ l 100% (v/v) Ethanol hinzugefügt und über Nacht bei -20°C gefällt.

## 16.7 Größenfraktionierung der cDNA über Sephacryl-S-500

Vorherige Versuche in unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, daß die im Kit-Protokoll angegebenen „Tropfen-Säulen“ unpraktisch im Einsatz waren. Daher verwendete ich zur Auftrennung der cDNA die in älteren Anleitungen gebrauchte Sephacryl-S 500-„Zentrifugen-Säule“. Als Säule diente eine 1 ml Einweg-Plastikspritze, bei welcher der Kolben entfernt wurde. Die Spitze wurde mit einer autoklavierten Glaskugel verstopft und danach bis zum Rand mit sehr gut durchmischter Sephacryl-S 500 Suspension gefüllt. Für die anschließende Zentrifugation (Heraeus; 2 min 400 g) wurde die Säule in ein 15 ml Falconröhrchen gestellt. Der Durchfluß wurde verworfen und die Spritze so oft mit Suspension gefüllt und zentrifugiert, bis sie letztlich zu  $\frac{3}{4}$  gefüllt war. Die so erhaltene Säule wurde 2x mit je 60  $\mu$ l 1x STE-Puffer gespült (Zentrifugation wie vorher) und anschließend direkt verwendet.

### 16.7.1 Größenfraktionierung

Das Sediment des *Xho* I Verdaus wurde für 30 min bei 4°C und 6000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 60  $\mu$ l STE-Puffer aufgenommen. Von einem Eppendorf-Reaktionsgefäß („Tube“) wurde der Deckel entfernt und das Restgefäß in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gestellt. Die soeben präparierte Säule wurde darüber eingesetzt und die cDNA-Lösung vorsichtig auf die Mitte der Säule pipettiert. Nach einer Zentrifugation (Heraeus; 2 min 400 g) wurde die Säule in ein frisches „Tube“ (in einem neuem Falconröhrchen) umgesetzt, 60  $\mu$ l 1x STE-Puffer dazugegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die so erhaltenen vier Durchflüsse stellten die Fraktionen I- IV dar. Von allen vier Fraktionen wurden je 5  $\mu$ l entnommen und in einem 1% Agarosegel kontrolliert (siehe B 21.).

### 16.7.2 Reinigung der Fraktionen

Die cDNA-Fraktionen wurden mit je einem Volumen Phenol/Chloroform [1:1 (v/v)] versetzt, gründlich gemischt und zur Phasentrennung 3 min zentrifugiert. Die oberen wässrigen Phasen wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und je ein Volumen Chloroform zugegeben. Nach gründlichem Mischen und 2 min Zentrifugation wurden die oberen Phasen erneut in frische Reaktionsgefäße über-

führt. Folgend wurde nach Zugabe des je doppelten Volumen 100% (v/v) Ethanol für 48 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  präzipitiert. Die gefällten cDNA-Fractionen wurden anschließend für 60 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 13000 g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Sedimente wurden vorsichtig mit je 200  $\mu\text{l}$  80% (v/v) Ethanol gewaschen, für 2 min bei 13000 g und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend luftgetrocknet. Die Wiederaufnahme erfolgte in je 3,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ .

## 16.8 Ligation der cDNA in die Vektorarme

Das für die Ligation optimale Verhältnis von cDNA zu Vektor betrug 100 ng /1  $\mu\text{g}$ . Um die Menge an eingesetzter cDNA abschätzen zu können, wurde mit je 0,5  $\mu\text{l}$  jeder Fraktion ein „Dot-Test“ mit einer 1%igen Agarose-Platte (siehe B 15.2) durchgeführt. Eine Kontrolligation wurde nicht angesetzt.

Es wurden die Fraktionen 2 und 3 mit jeweils dem gesamten Ansatz (3  $\mu\text{l}$ ) verwendet, daher mußte kein Wasser mehr zugesetzt werden. Trotzdem überschritt das maximale Volumen 5  $\mu\text{l}$  (5,5  $\mu\text{l}$ ).

3,0  $\mu\text{l}$  resuspendierte DNA  
0,5  $\mu\text{l}$  10x Ligase-Puffer  
0,5  $\mu\text{l}$  10 mM rATP (pH 7,5)  
1,0  $\mu\text{l}$  ZAP Express Vektor (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  
0,5  $\mu\text{l}$  T4 DNA-Ligase (4 U/ $\mu\text{l}$ )

Der Ansatz wurde gründlich gemischt und für 48 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Ein Teil (1  $\mu\text{l}$ ) der ligierten cDNA wurde direkt in Phagen verpackt, der Rest bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und später verpackt.

## 16.9 Verpackung der cDNA

Die Verpackungsansätze wurden der  $-80^{\circ}\text{C}$  Tiefkühltruhe entnommen und schnell zwischen den Fingern aufgetaut. Gerade wenn der Ansatz zu schmelzen begann, wurde 1  $\mu\text{l}$  der ligierten cDNA zugesetzt und die Lösungen zügig, aber vorsichtig, mit einer Pipettenspitze gemischt. Nach kurzer Anzentrifugation wurde die Reaktion bei Raumtemperatur für 110 min ruhig stengelassen. Zum Abstoppen der Verpackung wurden 500  $\mu\text{l}$  SM-Puffer zugesetzt, anschließend zur Entfernung von Zelltrümmern 20  $\mu\text{l}$  Chloroform zugegeben, vorsichtig gemischt und für 30 sec bei 3000 Upm zentrifugiert. Im entnommenen Überstand befanden sich die Bakteriophagen. Die so erhaltenen Primärbanken wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 16.10 Titerbestimmung der Primärbank

Zur Bestimmung des Titers wurde eine frische MgSO<sub>4</sub>-Kultur (siehe B 14.3) von XL1-Blue MRF<sup>+</sup> Bakterien mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 benötigt. Jeweils 200 µl der Bakteriensuspension wurden mit 1 µl der Primärbank beziehungsweise 1 µl einer 1:10 Verdünnung in SM-Medium (siehe B 14.1) versetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Diese Ansätze wurden anschließend mit 8 ml geschmolzenem und auf 48°C temperierten NZY-Top-Agar überschichtet, kurz gemischt und zügig auf vorgewärmte (40°C) große NZY-Platten ausgebracht (siehe B 14.1). Nach dem Erstarren des Top-Agars wurden die Platten umgedreht und bei 37°C für 7-8 h inkubiert. Es bildete sich ein geschlossener Bakterienrasen auf den Plattenoberflächen. Ausgehend von jeweils einem mit einem Phagen infizierten Bakterium entstanden Löcher im Rasen, sogenannte Plaques. Bei ausreichender Verdünnung war es möglich die Anzahl der Plaques und damit der „plaque forming units“ (pfu), d.h. die Anzahl der zuerst infizierenden Phagen zu bestimmen.

## 16.11 Amplifikation der Primärbank

In Primärbanken kann es vorkommen, daß ein Phage mit einem bestimmten (gesuchten) Insert nur ein einziges Mal vorkommt. Wird dieser Phage entnommen, ohne daß das Insert detektiert wird, ist die Information dauerhaft verloren. Um diesem Problem zu begegnen, kann die Bank amplifiziert werden. Dies sollte jedoch nur einmal stattfinden, da langsam wachsende Klone sonst statistisch unterrepräsentiert sind. 600 µl einer MgSO<sub>4</sub>-Kultur von XL1-Blue MRF<sup>+</sup> mit OD<sub>600</sub> 0,5 sollten mit  $\sim 5 \times 10^4$  pfu versetzt werden, wobei das Volumen der Phagenlösung 300 µl nicht übersteigen durfte. Es wurden 2 x 250 µl eingesetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml NZY-Top-Agar (50°C) und kurzem Mischen wurde zügig auf großen NZY-Platten ausplattiert. Nach dem Erstarren des Top-Agars wurden die umgedrehten Platten bei 37°C inkubiert. Nach 7 h waren deutliche Plaques zu erkennen, die Platten wurden nun mit 8-10 ml SM-Medium überschichtet und bei 4°C über Nacht sanft geschüttelt. Die aus dem Agar eluierten Phagen konnten so am nächsten Tag zusammen mit dem SM-Medium aufgenommen werden. Die Platten wurden mit weiteren 2 ml SM-Medium gespült und die beiden Mengen vereinigt. Nach Zugabe von Chloroform zu dem SM-Medium [Endkonzentration 5% (v/v)] wurde gut gemischt und die Lösung für 15 min bei Raumtemperatur ruhig stengelassen. Anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 500 g entfernt. Der Überstand wurde entnommen und die Reinigung wiederholt. Nachdem der Überstand klar erschien, wurde erneut Chloroform [Endkonzentration 0,3% (v/v)] zugesetzt und die amplifizierte Bank bei 4°C aufbewahrt. Zur dauerhaften Konservierung der Bank wurden Teile davon in 7% (v/v) DMSO bei -80°C gelagert. Die Titerbestimmung der amplifizierten Bank wurde wie unter B 16.10 beschrieben durchgeführt, nur daß hierbei Verdünnungen der Phagenlösung von 1:1, 1:10 und 1:100 verwendet wurden.

## 17. Durchsuchen der cDNA-Bibliothek („Screening“)

Die verwendete ZAP Express<sup>®</sup> cDNA-Bank bietet die Möglichkeit, die enthaltenen Inserts in Bakterien oder eukaryotischen Zellen zu exprimieren und anschließend zu detektieren. Dazu wurde die sogenannte „Plauefilterhybridisierung“ verwendet. Bei dieser Methode wird ein Plauemuster im Bakterienrasen, hervorgerufen durch Lyse phageninfizierter Bakterien, auf eine Membran übertragen („blotting“). Auf der Membran konnten entweder die exprimierten Proteine oder die cDNA selbst als Ziel dienen.

XL1 Blue MRF<sup>+</sup> Bakterien wurden wie unter B 16.10 beschrieben mit Phagen infiziert und ausplattiert. Für die erste Screening-Runde wurden maximal  $1 \times 10^5$  pfu je großer Agarplatte ausplattiert. Auf den sich bildenden Bakterienrasen wurden Filter aufgelegt. Die Filter wurden zur Orientierung an drei verschiedenen Punkten mit einer glühenden Nadel durchstoßen und vorsichtig abgezogen. Anschließend wurden entweder die von den Wirtsbakterien exprimierten Proteine (siehe B 17.1) oder die entsprechende cDNA (siehe B 17.2) detektiert. Die fertig detektierten Filter wurden unter die Agarplatten gelegt und auf dem Leuchttisch die zugehörigen Plaques identifiziert. Diese wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze ausgestochen. Die in den Agarstückchen enthaltenen Phagen wurden unter Schütteln bei 4°C über Nacht (min. 4 h) in 500 µl SM-Medium eluiert. Ausgehend von der entstandenen Phagensuspension wurden nach geeigneter Verdünnung frische Bakterien infiziert, auf frischen kleinen Agarplatten ausplattiert und wiederum der gesuchte Klon detektiert. Nach der zweiten oder dritten Vereinzelung war dann der positiv identifizierte Plaque für die weitere Verwendung (siehe B 18.) vollständig isoliert.

### 17.1 Screening mit Antikörpern

#### 17.1.1 Lösungen

<b>TBST</b>	10 mM Tris/Cl 140 mM NaCl 0,1% (w/v) Tween <sup>®</sup> 20 pH 8,8 mit HCl eingestellt
<b>Blockierungslösung</b>	1% (w/v) Milchpulver in TBST
<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-D-Galactosid

### 17.1.2 Das Verfahren

Für die Detektion von Klonen mit gesuchten Inserts dienten die exprimierten Proteine. Dadurch stieg die Wahrscheinlichkeit, Klone mit vollständig codierenden Inserts zu erhalten. Der Nachteil lag darin, daß bei diesem Verfahren nur Klone erfaßt wurden, deren Inserts im korrekten Leseraster lag. Die Expression der auf der cDNA codierten Proteine wurde durch Zugabe eines  $\beta$ -Galaktosids induziert, da der *lacZ*-Promotor vor der Klonierungsstelle liegt.

Nitrocellulosefilter (porablot NCP Ø 132 beziehungsweise 82 mm; Macherey-Nagel, Düren) wurden kurz in 10 mM IPTG getränkt. Die getrockneten Filter wurden auf den Bakterienrasen aufgelegt wenn die ersten Plaques sichtbar wurden (nach ca. 4 h bei 42 °C) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten mitsamt Filter für 30 min bei 4°C gekühlt. Nach kurzer Trocknung auf Whatman® 3M Papier wurde 3x 5 min in TBST unter sanftem Schütteln gewaschen. Nach Zugabe von Blockierungspuffer wurde für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Überschüssige Blockierungslösung wurde durch kurzes Waschen in TBST entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Die Antikörper waren dabei zwischen 1:20 und 1:5000 in TBST verdünnt.

Überschüssige Antikörper wurden durch erneutes dreimaliges Waschen in TBST entfernt. Der Alkalische Phosphatase gekoppelte sekundäre Antikörper wurde entsprechend dem primären Antikörper gewählt und in einer Verdünnung von 1:7500 in TBST eingesetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wurde erneut 3x mit TBST gewaschen. Die so behandelten Filter wurden dann für die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase eingesetzt (siehe B 11.).

## 17.2 Screening mit DNA-Sonden

### 17.2.1 Lösungen

<b>Denaturierungslösung</b>	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
<b>Neutralisierungslösung</b>	1,5 M NaCl 1 M Tris/Cl pH 7,4 mit HCl eingestellt
<b>Äquilibrierungslösung (2x SSC)</b>	0,3 M NaCl 0,03 M NaCitrat pH 7,0 mit HCl eingestellt

<b>Hybridisierungspuffer</b>	5x SSC 0,1% N-Laurylsarcosin 0,02% SDS 1% Blocking Reagenz zum Lösen auf ca. 50 °C erwärmen
<b>Waschpuffer</b>	0,15 M NaCl 0,1 M Tris/Cl pH 7,5 mit HCl eingestellt
<b>Blockierungslösung</b>	Waschpuffer 1% (w/v) Blockingreagenz

### 17.2.2 Digoxigenin-Markierung von DNA

DNA konnte nach entsprechender Markierung als Detektionsmittel eingesetzt werden. Die Markierung von DNA mit Digoxigenin (DIG) stellt durch seine hohe Empfindlichkeit (Sub-Pikogrammbereich) und seine einfache Handhabung (nichtradioaktive Reagenzien) ein ideales indirektes Reportersystem dar. In dem verwendeten „PCR-Dig-Labeling-Mix“ (Roche, Mannheim) lag das Hapten gekoppelt an ein Nucleotid (dUTP) vor und wurde während der Neusynthese der DNA-Sonde in einer PCR (siehe B 15.6) in den Nucleotidstrang eingebaut. DIG-11-dUTP lag hierbei im Gemisch der Nukleotide im Verhältnis 1:20 vor. Abweichend von den Herstellerangaben wurde statt 10 µl „PCR-Dig-Labeling-Mix“ für eine Markierungsreaktion nur 1 µl verwendet, was sich als völlig ausreichend für eine gute Digoxigeninmarkierung erwies. Als Vorlage der PCR dienten entweder Bereiche von unvollständigen Klonen des Störes oder vorhandene DNA nah verwandter Fische.

#### Kontrolle der DIG-Markierung

Um Abschätzen zu können wieviel DIG-markierte dUTP's in die DNA eingebaut wurden, konnte eine Kontrollreihe mit dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Boehringer, Mannheim) durchgeführt werden. Hierbei wurde 1 µl der markierten Sonde zusammen mit einer Verdünnungsreihe von Nucleotiden bekannter DIG-Konzentration auf eine Nylonmembran aufgetragen und diese für 30 min bei 80°C gebacken. Nach Absättigung für 30 min in Blockierungslösung wurde für 30 min mit anti-DIG-Fab-Fragment (1:7500 in Blockierungslösung) inkubiert. Anschließend wurde die Sonde mit der Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase detektiert.

### 17.2.3 Das Verfahren

Das DNA-Sonden Screening erlaubt es auch Klone zu detektieren, deren Inserts nicht im korrekten Leseraster liegen. Die Nylonmembranen (porablot NY amp, Ø 132 beziehungsweise 82 mm; Macherey-Nagel, Düren) wurden am nächsten Morgen nach Kühlung der Platten (30 min bei 4°C) aufgelegt. Nach 2-3 min wurden die Filter abgezogen und mit der Unterseite nach oben für 10 min auf ein mit Denaturierungslösung durchtränktes Whatman® 3MM Papier gelegt. Nach demselben Verfahren wurden die Filter dann anschließend neutralisiert (15 Minuten) und äquilibriert (10 Minuten). Um die Phagen-DNA fest an die Nylonmembran zu binden wurden die getrockneten Membranen anschließend 30 Minuten bei 80°C in einem Trockenschrank gebacken. Die fertigen Membranen konnten direkt weiterverwendet oder bei Raumtemperatur trocken gelagert werden.

Die Hybridisierungstemperatur ist neben dem G/C-Gehalt und der Länge der erwarteten Hybride vor allem von der Ähnlichkeit der Sonde zur Zielsequenz abhängig. Bei vollständiger Identität von Sonde und gesuchter (längerer) Zielsequenz wurde bei 68°C hybridisiert, bei unspezifischem Screening mußte die optimale Hybridisierungstemperatur empirisch ermittelt werden. In der Regel lag sie dabei zwischen 60°C und 66°C. Die Hybridisierungen erfolgten in Schüttelwasserbädern (Julabo, Seelbach). Vor der eigentlichen Hybridisierung wurden freie Bindungsstellen auf den Filtern durch Prähybridisieren abgedeckt. Dazu wurden die Filter für 1 h bei 68°C in Hybridisierungspuffer sanft geschüttelt. Für die Hybridisierung wurden 10 ng Digoxigenin markierte DNA (DIG-DNA, siehe B 17.2.2) in 30 ml Hybridisierungspuffer gelöst, für 10 min bei 95-100°C gekocht und auf Eiswasser abgekühlt. In dieser Lösung wurden die Filter bei der entsprechenden Temperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sonden-Lösung abgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Solche Sonden-Lösungen wurden mehrfach verwendet und nach dreimaligem Einsatz durch erneute Zugabe von 3 ng DIG-DNA aufgefrischt. Zur Entfernung von überschüssiger Sonde wurden die Filter für 2x 5 min in 2x SSC mit 0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Um fehlerhaft gebundene Sonden zu entfernen, wurde anschließend stringent gewaschen. Dazu wurden die Filter bei der ursprünglichen Hybridisierungstemperatur in 0,5x SSC mit 0,1% SDS für 2x 15 min leicht geschüttelt.

Es folgte die Blockierung der Membranen mit Blockierungslösung für 30 min bei Raumtemperatur. Zur Detektion der DNA-Sonde wurde ein spezifisches anti-Digoxigenin-Fab-Fragment (Roche, Mannheim) eingesetzt, an welches die Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Die Inkubation (1:7500 in Blockierungslösung) erfolgte erneut für 30 min. Überschüssige Fragmente wurden durch Waschen für 3x 5 min bei Raumtemperatur in Waschpuffer entfernt. Die so behandelten Filter wurden dann für die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase eingesetzt (siehe B 11.).

## 18. *In vivo*-excision

Das für die Erstellung der cDNA Bank eingesetzte ZAP Express™ cDNA Synthese-Kit verwendet den ZAP Express™-Vektor ( $\lambda$ -Vektor). Dieser stellt ein Kunstprodukt dar. Er enthält neben den  $\lambda$ -Armen des Phagen noch die Sequenz eines Phagemids (pBK-CMV), in welche das Insert eingeschlossen ist. Durch die *in vivo*-excision kann das Phagemid (mitsamt dem Insert) aus dem  $\lambda$ -Vektor extrahiert werden. Um den Start- und Endpunkt dieser Excision zu markieren, wurde der fl-Phagen „origin of replication; ori“ in seine Initiations- und Terminationsstelle getrennt und die Sequenz des Phagemids dazwischen eingepaßt. Für die *in vivo*-excision wurden Bakterien mit den  $\lambda$ -Phagen und einem Ex Assist™ Helfer Phagen (Stratagene, Heidelberg) koinfiziert. Innerhalb des Bakteriums erkennen Genprodukte des Helfer-Phagen die Initiationsstelle, verursachen dort einen Bruch („Nick“) der DNA und beginnen die Synthese von einzelsträngiger (ss)DNA „downstream“ bis zur Terminationsstelle. Das Genprodukt II des Helfer-Phagen zirkularisiert diese lineare ssDNA, wodurch wieder ein fl „ori“ entsteht. Durch das in der Terminationsstelle enthaltene Verpackungssignal wird die zirkularisierte ssDNA in Phagenhüllen verpackt und sezerniert. Um doppelsträngige DNA zu erhalten wurden *E. coli* XL0LR-Zellen mit den verpackten und sezernierten Phagen infiziert. Die Helfer-Phagen können nicht wachsen, da sie nicht in der Lage sind sich in Su<sup>-</sup>-Stämmen wie XL0LR zu replizieren

### Durchführung:

Zur Koinfektion von XL1-Blue Bakterien wurden 200  $\mu$ l Suspension (OD ~1, siehe B 14.3) mit 300  $\mu$ l  $\lambda$ -Phagensuspension aus Antikörper- oder DNA-„Screening“ und 1  $\mu$ l Ex Assist™ Helfer Phagen (Stratagene, Heidelberg) gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 300  $\mu$ l NZY-Medium für 3 h bei 37°C geschüttelt. Zur vollständigen Sezernierung der Phagen wurden die Bakterien durch 20minütiges Erhitzen auf 65-70°C getötet. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 1000 g (Heraeus; 4°C). Der Überstand mit den Phagemiden wurde aufgenommen und konnte bei 4°C für mehrere Monate aufbewahrt werden. 200  $\mu$ l XL0LR-Zellen wurden mit 100  $\mu$ l dieses Überstandes versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 300  $\mu$ l NZY-Medium wurde für 45 min bei 37°C geschüttelt. Der Phagemid-Vektor trägt ein Resistenz-Gen für Kanamycin. Durch Ausplattieren von 50-200  $\mu$ l des Ansatzes auf LB-Kanamycin-Platten und Inkubation über Nacht bei 37°C konnten infizierte Bakterien von solchen ohne Phagemid getrennt werden.

## 19. Plasmid-Präparation

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus 1,5 ml Flüssig-Kulturen erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden) beziehungsweise dem E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I der Firma Peqlab (Erlangen). Beide verwenden zum Aufschluß der Bakterien eine modifizierte alkalische Lyse. Nach Aufschluß der Zellen wurden Fragmenten und bakteriellen Proteinen durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde über eine Silicagelmatrix zentrifugiert, an welche die Plasmid-DNA unter den vorhandenen Bedingungen selektiv und reversibel band. Nach Aufreinigung mit den Puffern konnte die DNA durch Zugabe von bidest. H<sub>2</sub>O von der Matrix eluiert werden. Die Ausbeute beider Kits betrug maximal 10 ng, die in 50 µl bidest. H<sub>2</sub>O aufgenommen wurden. Dies entsprach einer Endkonzentration von 200 ng / µl. Die so gewonnen DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

## 20. Restriktionsverdau

Um eine Vorauswahl der zu sequenzierenden Klone treffen zu können, wurden die Inserts aus den Plasmiden herausgeschnitten und mittels DNA-Gelelektrophorese (siehe B 21.) die ungefähre Molekülmasse bestimmt. Der Plasmidvektor enthält innerhalb seiner „multiple cloning site“ (MCS) spezifische Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen. Durch die passende Auswahl zweier Nucleasen (Stratagene, Hamburg) am 5'- beziehungsweise 3'-Ende des Inserts konnte dieses durch den Verdau aus dem Vektor herausgetrennt werden. Dabei wurden die Nucleasen so ausgewählt, daß sie nach Herstellerangaben gleiche oder ähnliche Pufferkonzentrationen benötigten. War solch ein Doppelverdau nicht möglich, wurde zweimal ein einfacher Verdau durchgeführt.

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

- 2 µl DNA-Lösung (ca. 400 ng in bidest. H<sub>2</sub>O)
- 2-4 µl 10× Reaktions-Puffer (entsprechend Herstellerangabe)
- je 0,5 µl Restriktionsenzym (~1,5 U/µl)
- 12-14 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Der Verdau erfolgte im Brutschrank für 1 bis 1,5 h bei 37°C. Sofern die DNA nicht direkt im Agarosegel aufgetrennt wurde, erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Erhitzen auf 65°C.

## 21. Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarose-Gel

### 21.1 Lösungen

<b>TBE 1x</b>	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,3
<b>Beladungspuffer 10x</b>	50% Glycerin 0,4% Bromphenolblau 0,4% Xylencyanol

### 21.2 Vorbereitung des Geles und die Elektrophorese

Je nach Größe der erwarteten Fragmente wurden Gele mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 1,3% Agarose angesetzt. Dazu wurden die entsprechenden Mengen an Agarose durch Aufkochen in TBE gelöst (ca. 80 ml) und mit 0,01% Ethidiumbromid versetzt. Bei einem DNA-Agarosegel ist, anders als bei RNA, kein Formaldehyd notwendig. Der Gelschlitten wurde oben und unten mit Riegeln sowie Tesafilm<sup>®</sup> verschlossen und die Gellösung nach Abkühlung auf ca. 55°C eingegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die Abdichtungen entfernt und das Gel in die Kammer (horizontale Minigelkammer; Biotec, Reiskirchen) eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1x TBE bis knapp über das Gel aufgefüllt und der Probenkamm entfernt. Die mit Beladungspuffer (Endkonzentration 1x-1,5x) versetzten Proben wurden in die Geltaschen eingefüllt und die Elektrophorese mit 90-110 V gestartet. Die Elektrophorese wurde im Allgemeinen abgestoppt wenn die Bromphenolblaubande den unteren Gelrand erreichte. Die Gele wurden entnommen im UV-Durchlicht ausgewertet und anschließend zur Dokumentation Bilder mit einem „Video-Copy-Processor“ (Mitsubishi) angefertigt.

## 22. Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Wurde DNA elektrophoretisch aufgetrennt (siehe B 21) konnte sie aus dem Agarosegel zurückgewonnen werden. Dazu wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen (Hilden) verwendet. Zur Extraktion der DNA wurde in diesem System eine Silicagel-Matrix verwendet. In Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotropischer Salze und einem pH-Wert <7,5 band die DNA an diese Matrix.

### Durchführung:

Agarosestückchen mit den gewünschten Fragmenten wurden mit einem frischen Skalpell aus den Gelen ausgeschnitten und deren Gewicht bestimmt. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Puffer wurde die Agarose durch Erwärmen auf 52°C für 10 min und gelegentlichem Vortexen gelöst. Die erhaltenen Lösungen wurden in Zentrifugenröhrchen, mit einem Boden aus einer Silicagel-Matrix, zentrifugiert. Beim Durchfluß der Lösung band die DNA an die Matrix. So gebundene DNA konnte durch Zugabe von Puffern gereinigt und abschließend durch Zugabe von bidest. H<sub>2</sub>O wieder eluiert werden.

## **23. DNA-Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen**

Plasmide deren Inserts eine Mindestgröße von 1 kbp aufwiesen, wurden zur Sequenzierung an die Firmen SeqLab (Göttingen) und GENterprise (Mainz) gegeben. Eine Ansequenzierung erfolgte vom 5'-Ende her über den Vektor-Primer T3. Die Ausgabe der uneditierten Daten (DNA-Sequenz als Text und Chromatogramm) erfolgte per E-Mail. Die Chromatogramme konnten mit dem Programm „Chromas 1.5.1“ eingesehen und editiert werden. Die so bearbeiteten Sequenzen wurden zur Identifizierung und Einordnung mit schon bekannten Sequenzen verglichen. Das Internet-Programm „Blast“ ermöglichte die Suche nach ähnlichen DNA- („BlastN“) und Proteinsequenzen („BlastP“). Eine Übersetzung in alle sechs Leseraster und anschließendem Vergleich mit Proteindatenbanken ermöglichte „BlastX“. Die Übersetzung der Nucleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem „Expasy-Tool Translate“, die Bearbeitung mit „Align“ und „Lalign“ (alle Internet). Interessierende Klone konnten so identifiziert und weiter bearbeitet werden. Die vorhandenen T3-Primer-Ansequenzierungen konnten dann zumeist auf ca. 800 bp verlängert werden. Zusätzlich wurden Sequenzierungen (ebenfalls etwa 800 bp) vom 3'-Ende (Vektor Primer T7) her ausgeführt. Zur vollständigen Identifizierung der Inserts wurden mit dem DOS-Programm „Oligo 3.4“ neue Primer (Roth, Karlsruhe) aus den bereits bekannten Bereichen herausgesucht und so die Sequenzierungen weitergeführt. Durch dieses „primer-walking“ konnten die gesamten Sequenzen der Inserts doppelsträngig ermittelt werden.

War ein Insert vollständig sequenziert, konnte die Eigenschaften des zugehörigen Proteins mit dem „Expasy Tool Prot-Param“ bestimmt und ein theoretischer tryptischer Verdau mit dem „Expasy Tool Peptide-Mass“ (beide Internet) durchgeführt werden. Datenbankabgleiche von gemessenen MALDI-MS-Fragmentmassen mit bekannten Proteinen konnten mit dem „Expasy Tool PepIdent“ (Internet) durchgeführt werden.

Das Windows-Programm „ClustalX 1.8.1“ berechnete Sequenzvergleiche („Alignments“) von multiplen DNA- und Aminosäuresequenzen. Solche Alignments konnten mit „Genedoc“ (Windows)

bearbeitet und konvertiert werden. Sie dienten zur Berechnung von Identitätstabellen („Mega“, Windows), Distanzmatrizes und molekularen Stammbäumen (PHYLIP, Windows). Die erhaltenen Stammbäume wurden mit Tree-Explorer (Mega) und „Treeview 1.6.6“ (Windows) ausgewertet. Die Internetadressen der Programme sind im Anhang F4 aufgeführt.

### 23.1 Molekulare Phylogenie

Für die Berechnung von molekularen Stammbäumen wurden Proteinsequenzalignments benutzt. Dazu wurde „ClustalX“ mit seinen Standardeinstellungen verwendet (Thompson et al., 1997). Einige der Proteinsequenzen wiesen nur unvollständige Head- beziehungsweise Tail-Domänen auf. Daher wurden diese Domänen mit „Genedoc“ bei allen Sequenzen entfernt, so daß nur noch die Rod-Domäne übrigblieb. Aus den verbliebenen Sequenzabschnitten wurden die Lücken („Gaps“) wieder entfernt und erneut ein Vergleich durchgeführt. Mit den so erhaltenen Alignments der Rod-Domänen konnten die Distanzen zwischen den Sequenzen berechnet werden. Dazu wurde das Programm „ProtDist“ aus dem Programmpaket „Phylip 3.6“ mit seinen Standardeinstellungen verwendet. Die Berechnung erfolgte nach dem „Jones-Taylor-Thornton-Modell“ (JTT). Die JTT-Matrix stellt eine Erweiterung der „PAM001-Matrix“ von Dayhoff dar, mit der die Häufigkeit von bestimmten Aminosäureaustauschen statistisch erfaßt wird (Dayhoff et al., 1979; Jones et al., 1992).

Die so berechneten Distanzmatrizen wurde zur Erstellung von phylogenetischen Bäumen benutzt. Dazu wurde das Programm „Neighbor“ ebenfalls mit seinen Standardeinstellungen aus dem selben Paket verwendet. Das Programm berechnet Abstammungslinien und Verzweigungspunkte nach der „Neighbor-Joining“-Methode (Saitou und Nei, 1987). Diese Methode nimmt weder eine konstante Evolutionsrate noch die Existenz einer expliziten Außengruppe an. Der erhaltene Baum enthält daher keine Angaben über evolutionäre Richtungen.

Ein so berechneter Stammbaum enthält keinerlei Informationen darüber, mit welcher Wahrscheinlichkeit er mit dem tatsächlichen übereinstimmt. Zur statistischen Absicherung wurden die Alignments daher einem „Bootstrapping“ unterzogen. Das Programm „Seqboot“ (Phylip) erzeugt aus dem Alignment (zumeist) 100 Pseudosamples. Dabei werden nach dem Zufallsprinzip einzelne Positionen innerhalb des Alignments dupliziert, andere deletiert, wobei sich die Länge aber nicht ändert. Die Pseudosamples werden mit den beiden oben beschriebenen Programmen einzeln neu analysiert. Aus den erhaltenen multiplen Datensätzen vereinigt das Programm „Consense“ (Phylip) die am häufigsten gewählten Verzweigungen in einem neuen Baum. Die Häufigkeit mit der eine Verzweigung in allen Pseudosamples auftaucht, wird als „Bootstrap-Wert“ bezeichnet. Ein Bootstrap-Wert von 70 bedeutet, daß die Verzweigung in 70 von 100 „Pseudosamples“ vorkommt (70%). Die mit dieser Methode berechneten Stammbäume geben jedoch nicht die zeitliche Abfolge der Aufspaltungseignisse wieder. Sie zeigen nur ein Netzwerk von Verwandtschaftsverhältnissen. Erst das sogenannte

„Rooting“, das heißt die Bestimmung einer Außengruppe, ergibt die Richtung eines Stammbaums und verleiht ihm eine historische Bedeutung.

Identitätstabellen wurden aus Sequenzalignments von ClustalX mit dem Programm „MEGA“ (Windows) berechnet. Mit der verwendeten „p-distance“-Methode (**p**roportion) wird die Anzahl der aufgetretenen Aminosäureunterschiede in zwei Sequenzen durch die Anzahl der insgesamt verglichenen Positionen dividiert. Bedingt durch Methode enthalten die errechneten Identitätswerte keine Korrektur von möglichen multiplen Substitutionen (Nei und Kumar, 2000).

## 24. MALDI-Massenspektrometrie

Die Zuordnung der ermittelten Sequenzen zu den Proteinflecken im 2D-Gel erfolgte durch MALDI-TOF-MS (**m**atrix-**a**ssisted **l**aser-**d**esorption/**i**onization - **t**ime **o**f **f**light – **m**ass **s**pectromery).

Bei diesem Verfahren werden Peptidfragmente durch Cokristallisation in eine Matrix eingebaut und im Hochvakuum einem intensiven kurzwelligigen Laserstrahl weniger Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Die Matrix (z.B.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure) wird so gewählt, daß sie eine hohe Absorption bei der gewählten Laserwellenlänge zeigt. Durch die Bestrahlung kommt es zu einer Explosion der Festkörperoberfläche, bei der neben Matrixmolekülen auch ionisierte Probenmoleküle freigesetzt werden. Um die Probe wird ein elektrostatisches Feld von einigen 100 bis zu mehreren 1000 V/mm angelegt, wodurch je nach Polarität des Feldes positiv oder negativ geladene Ionen von der Probenoberfläche in Richtung eines Analysators beschleunigt werden. Bei dem eingesetzten Massenanalysator handelt es sich um ein Flugzeitmassenspektrometer (TOF-Analysator; **t**ime **o**f **f**light), der anhand der benötigten Zeit vom Ablösen der Probenteile bis zum Auftreffen auf den Detektor die Masse bestimmt, wobei kleinere Fragmente schneller fliegen als große.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit dem theoretischen tryptischen Verdau (Internetprogramm „ExPasyTools“: „Peptide-Mass“) der zu untersuchenden Proteine verglichen. Grundlage hierfür war die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Peptidfragmente der Probe stammten aus Proteinen einer IF-Präparation (siehe B 5.), die in einem Coomassie-gefärbten 2D-Gel getrennt (siehe B 7.) und tryptisch verdaut wurden. Des Weiteren konnte ein Vergleich der Chromatogramme verschiedener Proteinflecken, denen noch keine Aminosäuresequenz zugeordnet werden konnte, deren Identität untereinander klären. Die Massenspektrometrie wurde von Dr. Christian Hunzinger (Fa. Proteosys, Mainz) durchgeführt.

## C Ergebnisse

### 1. Allgemeines und Vorgehensweise

Bisher lagen von der Gattung *Acipenser* noch keine Informationen über IF-Proteine vor. Ziel meiner Arbeit war es daher, von einem Vertreter dieser Gattung, dem Sibirischen Stör *Acipenser baeri*, so viele Informationen über IF-Proteine vom Typ I-III zu sammeln wie möglich. Dazu wurde ein Tier präpariert und die erhaltenen Gewebe mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Bei der Präparation gelang es auch das Geschlecht des Tieres zu bestimmen. Es handelte sich um ein Weibchen, da Ovarien gefunden wurden.

Von verschiedenen speziell in Isopentan eingefrorenen Geweben wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und diese mit verschiedenen Antikörpern gegen Intermediärfilamente inkubiert.

Zusätzlich wurden IF-Proteine direkt aus den Geweben extrahiert und biochemisch aufgetrennt. Mit Hilfe des Komplementären-Keratin-Blot-Bindungs-Tests (CKBB) und diversen Antikörpern konnten die jeweiligen IF-Proteine dann in die Typen I-III eingeteilt werden. Die Kombination der einzelnen Ergebnisse und das Wissen um die Herkunft der Gewebe erlaubte zusätzlich die Einteilung in „E“- und „S“-Keratine. Die so aufgetrennten Proteine wurden zumeist noch einer MALDI-MS-Analyse unterzogen.

Zur Ermittlung von Sequenzdaten wurde aus einem Gewebegemisch von Kieme, Muskel und Dermis erst Gesamt-RNA und daraus folgend mRNA isoliert. Hieraus wurde eine cDNA-Bank erstellt und diese mit verschiedenen Antikörpern und DNA-Sonden durchsucht („Screening“). Die aus der mRNA hergestellte cDNA wurde einer Größenfraktionierung unterzogen. Von den vier dabei erhaltenen Fraktionen wurden die zweite und dritte für die Ligation in den ZAP-Express Vektor ausgewählt. Von jedem dieser Ligationsansätze wurde zuerst 1 µl (I), später der gesamte restliche Ansatz (II) für die Verpackung verwendet (siehe B16.7-B16.9). Die daraus erhaltenen Teil-Primärbanken (2I, 3I, 2II und 3II) hatten einen Titer von 39.500 (2I), 31.500 (3I), 65.000 (2II) beziehungsweise 52.500 (3II) pfu. Da die Fraktion 2 die größeren cDNA-Fragmente enthielt, wurden die daraus resultierenden Banken, soweit nicht anders angegeben, beim „Screening“ verwendet. Von den Agarplatten zur Bestimmung des Primärtiters der Banken 2I und 3I wurden exemplarisch 10 Plaques ausgestochen und ansequenziert. Damit konnten zwar keine IF-Proteine detektiert werden, dafür aber zwei Klone, die für vollständige Glucose-6-Phosphat-Isomerasen codieren.

Nach Ermittlung der cDNA-Sequenzen und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurde über Datenbankvergleiche die Einordnung in die einzelnen IF-Protein-Typen vorgenommen.

Die Kombination der Ergebnisse der MALDI-MS-Analyse mit den bearbeiteten Sequenzdaten erlaubte häufig eine Zuordnung der erhaltenen cDNA-Sequenzen zu den biochemisch identifizierten

Keratinen und Typ III-IF-Proteinen. Dies gab nicht nur Hinweise über den jeweiligen Expressionsort der sequenzierten IF-Proteine, sondern erlaubte auch eine Bestimmung der „E“- und „S“-Keratine. Zum Abschluß konnte aus der Zusammenführung aller gewonnenen Daten ein Expressionskatalog der sequenzierten IF-Proteine des Sibirischen Störs aufgestellt werden.

Die von mir ermittelten Sequenzdaten wurden bereits in anderen Publikationen zur Berechnung von Stammbäumen verwendet (Haberkamp et al., 2001; Schultess, 2001; Schaffeld et al., 2001a). Hierbei kamen jedoch die internen Labornamen der codierenden Klone zum Einsatz. Da ab dieser Arbeit nur noch die vereinheitlichten Namen der IF-Proteine und der dafür codierenden Klone verwendet werden sollen, wurden im Anhang F5, Tab. 11 die verschiedenen Namen gegenübergestellt. Die wichtigsten Eckdaten der Klone und der abgeleiteten Proteine wurden in Tab. 6 (siehe C8) zusammengefaßt. Die dazugehörigen Nucleotidsequenzen finden sich im Anhang F8. Die angegebenen Massen ( $M_r$ ) und isoelektrischen Punkte (pI) der abgeleiteten Proteine wurden aus den Aminosäuresequenzen errechnet. Diese Werte sind rein theoretischer Natur und können durch posttranslationale Modifikationen und dadurch, daß sie in 8 M Harnstoff gemessen wurden, von denen der tatsächlichen Proteine abweichen. Im Folgenden werden die cDNA-Klone von *Acipenser baeri* (*aba*, *Aba*) in Kleinbuchstaben und kursiv benannt (z.B. *abak8*), die daraus abgeleiteten Proteinsequenzen dagegen mit großen Anfangsbuchstaben und nicht-kursiv (z.B. *AbaK8*).

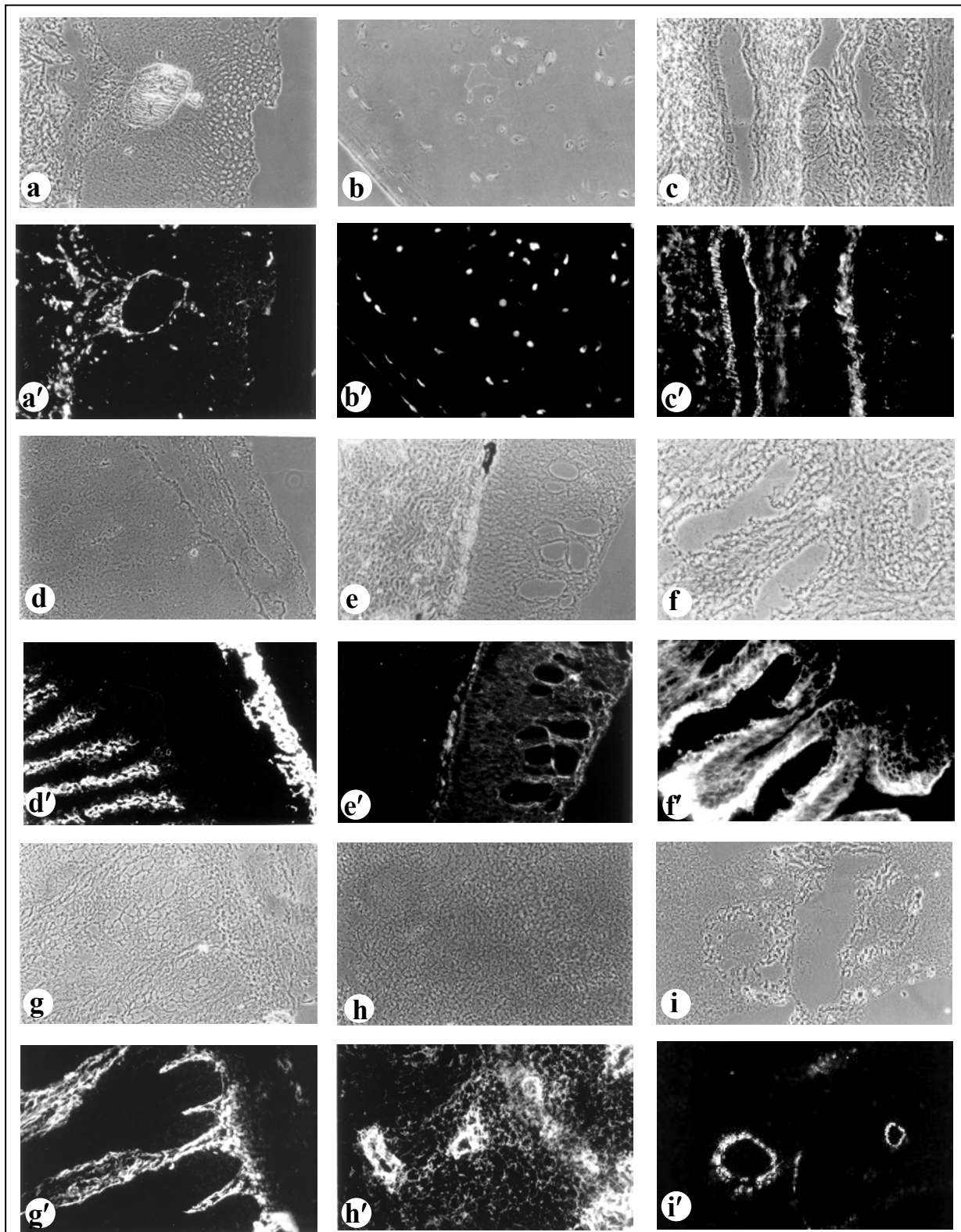
## 2. Gewebetypische Expression der IF-Proteine vom Typ I-III

Um Einsicht in die generelle Verteilung der Intermediärfilamente vom Typ I-III des Störs *Acipenser baeri* zu erlangen, wurden verschiedene Gewebe mittels der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Dabei wurden sowohl monoklonale, als auch polyklonale Antikörper auf einer Reihe einschichtiger und mehrschichtiger Gewebe getestet. Die Ergebnisse wurden bereits in der von mir mitbetreuten Diplomarbeit von Nicole Tappe (Tappe, 2000) beschrieben. Daher sollen an dieser Stelle nur die wichtigsten Daten in aller Kürze gezeigt werden.

Beim Stör wird Vimentin, wie beim Flösselhecht und den terrestrischen Tetrapoden, aber anders als bei den Teleostern, in zahlreichen mesenchymalen Geweben exprimiert. Die Keratine hingegen zeigen ein Expressionsmuster, wie es bei den Teleostern zu finden ist. Sie werden epithelial und mesenchymal exprimiert. Beim Flösselhecht und den terrestrischen Tetrapoden ist ihre Expression hingegen auf epitheliale Gewebe beschränkt.

In Abb. 3 a' - c' ist zu erkennen, daß der monoklonale Antikörper VIM14.13 mesenchymale Zellen und Gewebe markierte. In der Körperwand (Abb. 3 a, a') wurden die Schuppenanlage und einige Fibroblasten dekoriert. In der Kieme reagierte der Antikörper mit den Knorpelzellen (Abb. 3 b, b'), aber nicht mit der Muskulatur (nicht abgebildet). Im Magen (Abb. 3 c, c') wurde ausschließlich Bindegewebe angefärbt.

In Abb. 3 d' - f' ist die Reaktion von Anti-Keratin-Antikörpern in mehrschichtigen (d', e') und einschichtigen (f') Epithelien zu erkennen. Der monoklonale Antikörper 68.4 dekorierte in der Kieme (Abb. 3 d, d') das Mucosaepithel und das respiratorische Epithel der Sekundärlamellen. Der ebenfalls monoklonale Antikörper KL1 markierte in der Körperwand (Abb. 3 e, e') die Epidermis. Im Magen (Abb. 3 f, f') dekorierte der Antikörper 68.4 zwar das Mucosaepithel, aber nicht die Lamina propria. Eine andere Reaktion zeigten die monoklonalen Antikörper 164.4 und 79.14 (Abb. 3 g' - i'). So erkannte 79.14 im Magen (Abb. 3 g, g') die Lamina propria, dafür aber nicht das Mucosaepithel. Ebenso wurden Strukturen in der Milz dekoriert (Abb. 3 h, h'). Sowohl 79.14 als auch 164.4 markierten in der Leber (Abb. 3 i, i') das um die Gallengänge liegende Bindegewebe.



**Abb. 3** Immunfluoreszenzmikroskopie an 5µm dicken Gefrierschnitten unterschiedlicher Gewebe des Störs *Acipenser baeri*; a-i Phasenkontrastaufnahmen, a'-i' Fluoreszenzaufnahmen.

(a, a') Schuppenanlage und Fibroblasten in der Körperwand, AK VIM14.13; (b, b') Knorpelzellen in der Kieme, AK VIM14.13; (c, c') Gefäß, Bindegewebe und Muskulatur im Magen, AK VIM14.13; (d, d') Epithel und Sekundärlamellen der Kieme, AK 68.4; (e, e') Epidermis der Körperwand, AK KL1; (f, f') Mucosaepithel und Lamina propria des Magens, AK 68.4; (g, g') Mucosaepithel und Lamina propria des Mitteldarms, AK 79.14; (h, h') Bindegewebe der Milz, AK 79.14; (i, i') Blutgefäß und Gallengang in der Leber, AK 164.4

### 3. Biochemische Identifizierung der IF-Proteine vom Typ I-III

Im Rahmen der von mir mitbetreuten Diplomarbeit von Nicole Tappe wurden die verschiedenen Keratine sowie Desmin und Vimentin biochemisch identifiziert. Dazu wurden aus ausgewählten Geweben die IF-Proteine extrahiert und in einer zweidimensionalen PAGE aufgetrennt. Der Komplementäre-Keratin-Blot-Bindungs-Test (CKBB-Test) gab Aufschluß darüber, ob in den entsprechenden Geweben Keratine exprimiert werden und mit welchem Typ sie heteropolymerisieren. Zur Identifikation von Desmin und Vimentin wurden Immunoblots mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse wurden bereits ausführlich in der Diplomarbeit (Tappe, 2000) beschrieben und werden deshalb hier nur exemplarisch dargestellt.

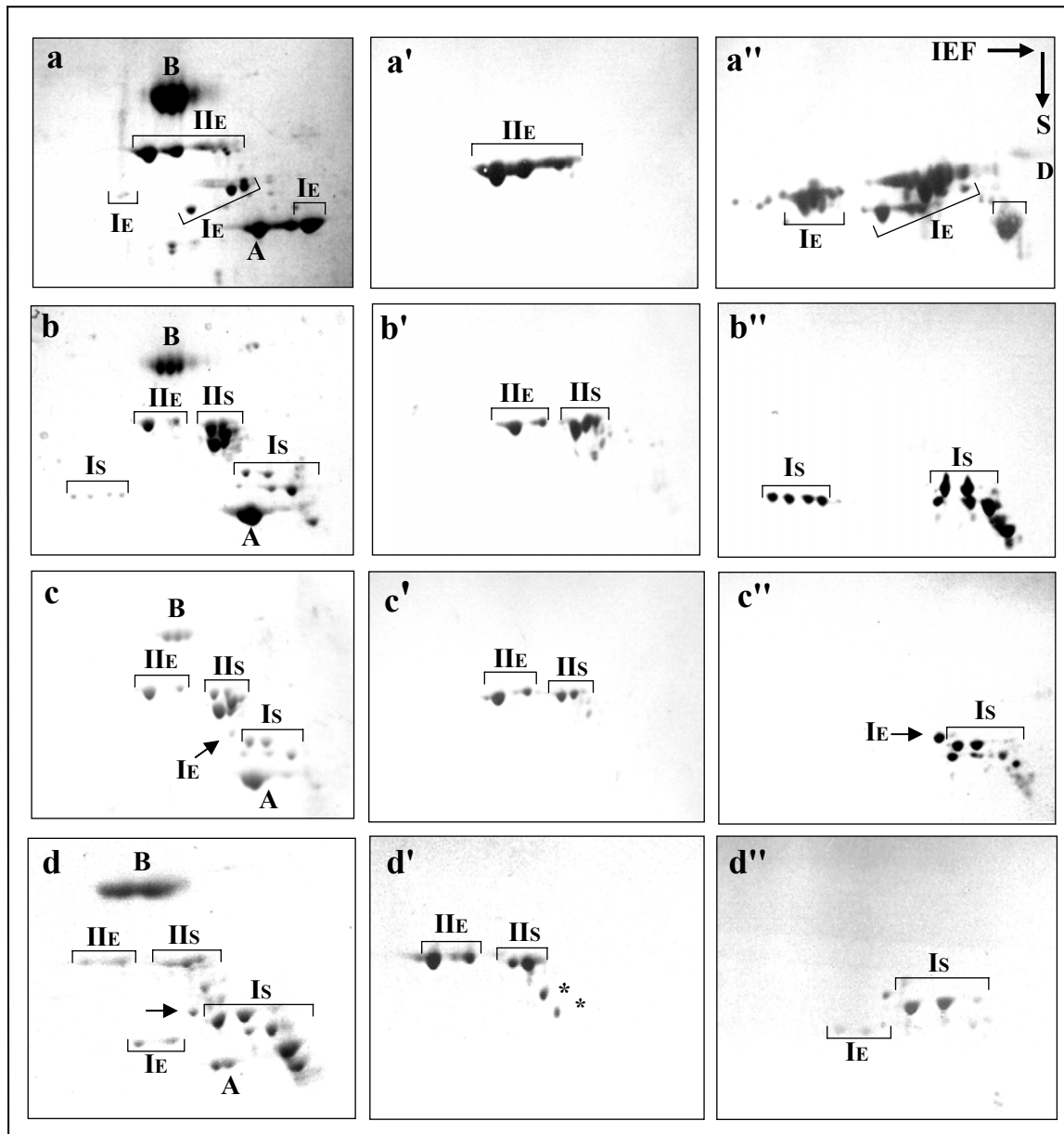
#### 3.1 Biochemische Identifizierung der „E“- und „S“-Keratine

Keratine können *in vitro* mit jedem Vertreter des komplementären Typs Heterodimere bilden. Der Komplementäre Keratin-Blot-Bindungs-Test (CKBB-Test) nutzt diese Eigenschaft aus. Die auf eine Membran geblotteten IF-Proteine werden jeweils mit biotinyliertem humanem Keratin K8 (Typ II) oder K18 (Typ I) inkubiert. Bei einer Reaktion kann so der komplementäre Keratin-Typ nachgewiesen werden.

Für die Identifikation von „E“-Keratinen wurden Organe mit mehrschichtigen Epithelien, wie Körperwand und Seitenflosse, gewählt. Gewebe mit einfachen Epithelien, wie Mitteldarm und Magen, identifizierten „S“-Keratine. Die positiv reagierenden Proteinflecke aus unterschiedlichen Geweben traten größtenteils an vergleichbaren Positionen im Gel beziehungsweise Blot auf. Es dürfte sich dabei um Keratinkandidaten handeln, deren Expression nicht nur auf ein Organ beschränkt ist. Eine Kombination aller Daten eröffnete dann ein Bild über die Verteilung der einzelnen Keratintypen in den Geweben (siehe Abb. 4, nächste Seite).

In einer Präparation von Flossengewebe (Abb. 4 a-a") konnte ein komplexes Muster von „E“-Keratinen nachgewiesen werden. Da die Flossenepidermis nicht vollständig isoliert, sondern nur zusammen mit Teilen des umliegenden Gewebes verarbeitet werden konnte, mußte mit Spuren von Vimentin und Desmin gerechnet werden. Dies bestätigte sich auch in den entsprechenden Kontrollen (siehe Abb. 5 b-b'). In einer Präparation von Mitteldarmgewebe (Abb. 4 b-b") wurden neben Vimentin (siehe Abb. 5 c-c') zahlreiche Keratine nachgewiesen. Diese konnten jedoch nicht durchgängig als „S“-Keratine eingestuft werden, es fanden sich auch bereits bekannte Typ II „E“-Keratine darunter. Typisch für Mitteldarmgewebe sind die vier Typ I<sub>S</sub>-Keratine im unteren linken Quadranten. Sie finden sich nur hier, obgleich der Magen ebenfalls mit einschichtigem Epithel ausgekleidet ist (Abb. 4 c-c"). Dafür konnte hier ein zusätzliches Typ I<sub>E</sub>-Keratin nachgewiesen werden, welches anscheinend nur im

Magen vorkommt. Die Kieme (Abb. 4 d-d'') enthält sowohl einschichtige, als auch mehrschichtige Epithelien. Durch einen Vergleich mit den oben beschriebenen Daten konnten die diversen Keratine innerhalb der Kieme zugeordnet werden. Zusätzlich konnte in der Kieme noch Desmin nachgewiesen werden (siehe Abb. 5 a-a').



**Abb. 4** Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) von Cytoskelettproteinen des Störs aus Flossengewebe (a-a''), dem Mitteldarm (b-b''), des Magens (c-c'') und der Kieme (d-d''). In der ersten Dimension erfolgte eine isoelektrische Fokussierung (IEF), in der zweiten Dimension eine SDS-PAGE. Markerproteine:  $\alpha$ -Aktin (A) und Bovine Serum Albumin, BSA (B).

(a, b, c) Mit Coomassie Blue gefärbtes Gel

(a', b', c') CKBB-Test mit biotinyliertem humanem Keratin K 18 (identifiziert Typ II-Keratine)

(a'', b'', c'') CKBB-Test mit biotinyliertem humanem Keratin K 8 (identifiziert Typ I-Keratine)

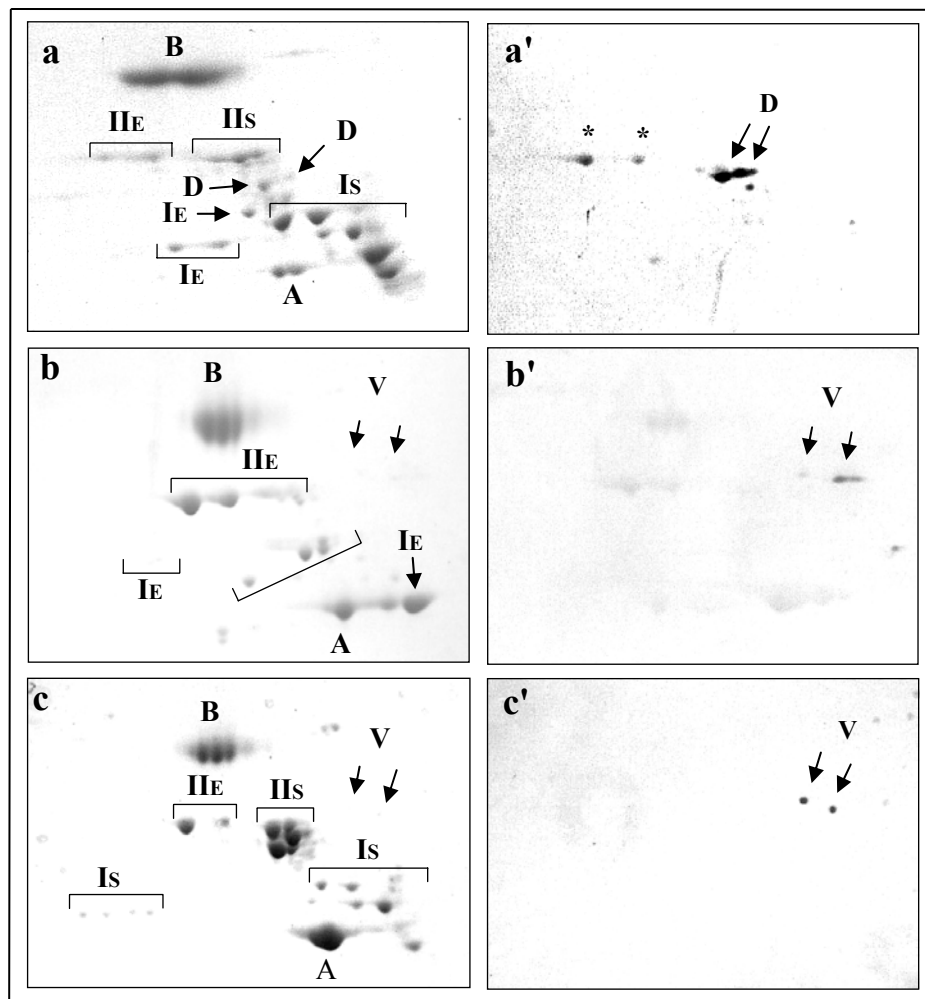
(\*) Mögliche Abbauprodukte der IIs-Keratine

In einer Präparation von Flossengewebe (Abb. 4 a-a") konnte ein komplexes Muster von „E“-Keratinen nachgewiesen werden. Da die Flossenepidermis nicht vollständig isoliert, sondern nur zusammen mit Teilen des umliegenden Gewebes verarbeitet werden konnte, mußte mit Spuren von Vimentin und Desmin gerechnet werden. Dies bestätigte sich auch in den entsprechenden Kontrollen (siehe Abb. 5 b-b'). In einer Präparation von Mitteldarmgewebe (Abb. 4 b-b") wurden neben Vimentin (siehe Abb. 5 c-c') zahlreiche Keratine nachgewiesen. Diese konnten jedoch nicht durchgängig als „S“-Keratine eingestuft werden, es fanden sich auch bereits bekannte Typ II „E“-Keratine darunter. Typisch für Mitteldarmgewebe sind die vier Typ I<sub>S</sub>-Keratine im unteren linken Quadranten. Sie finden sich nur hier, obgleich der Magen ebenfalls mit einschichtigem Epithel ausgekleidet ist (Abb. 4 c-c"). Dafür konnte hier ein zusätzliches Typ I<sub>E</sub>-Keratin nachgewiesen werden, welches anscheinend nur im Magen vorkommt. Die Kieme (Abb. 4 d-d") enthält sowohl einschichtige, als auch mehrschichtige Epithelien. Durch einen Vergleich mit den oben beschriebenen Daten konnten die diversen Keratine innerhalb der Kieme zugeordnet werden. Zusätzlich konnte in der Kieme noch Desmin nachgewiesen werden (siehe Abb. 5 a-a').

### **3.2 Biochemische Identifikation von Desmin und Vimentin**

Zur Identifikation von Desmin und Vimentin wurden Immunoblots durchgeführt. Mit einem polyklonalen Anti-Desmin-Antikörper (DES) konnte Desmin sowohl im Muskelgewebe, als auch in der Kieme (Abb. 5 a-a'), nachgewiesen werden.

Zur biochemischen Identifikation von Vimentin dienten Seitenflossengewebe, Mitteldarmgewebe und Muskelgewebe (Abb. 5). Zur Detektion der Proteine wurde der monoklonale Anti-Vimentin-Antikörper Vim13.14 verwendet. Um auszuschließen, daß es sich bei den gefundenen Proteinen um Keratine handelt, wurden die Ergebnisse zusätzlich mit den vorangegangenen CKBB-Tests verglichen.



**Abb. 5** Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) der Cytoskelettproteine von Kieme (a,a') Flosse (b,b') und Mitteldarm (c,c') des Störs. In der ersten Dimension erfolgte eine isoelektrische Fokussierung (IEF), in der zweiten Dimension eine SDS-PAGE. Markerproteine:  $\alpha$ -Aktin (A) und Bovine Serum Albumin, BSA (B).

(a, b, c) Mit Coomassie Blue gefärbtes Gel

(a') Immunoblot mit dem polyklonalen Anti-Desmin-Antikörper DES (D= Desmin)

(b', c') Immunoblot mit dem monoklonalen Anti-Vimentin-Antikörper Vim14.13 (V=Vimentin)

(\*) Hintergrund vermutlich auf Grund sehr langer Inkubationszeit

## 4. Sequenzierung von Keratinen

Aus den verschiedenen cDNA-Teilbanken konnten insgesamt zehn für Keratine codierende Klone gewonnen werden. Sieben der abgeleiteten Aminosäuresequenzen codieren für Typ I-Keratine und drei für Typ II-Keratine. Bei zwei Klonen fehlen den Inserts wenige Basen im 5'-Bereich, um für je ein vollständiges Typ I beziehungsweise Typ II-Keratin zu kodieren. Sechs der Typ I-Sequenzen (inklusive der unvollständigen) konnten Proteinflecken der 2D-PAGE zugewiesen werden. Bei den Typ II-Keratinen war es die unvollständige Sequenz, die eindeutig einem Proteinfleck zugewiesen werden konnte. Eine tabellarische Übersicht der wichtigsten Daten aller sequenzierten IF-Proteine und der für sie codierenden Klone findet sich unter C8.

### 4.1 Für Typ I-Keratine codierende cDNA-Klone (*abak10* bis *abak15*, *abak18*)

Die für Keratine vom Typ I codierenden Klone *abak10* bis *abak15* und *abak18* wurden mit Hilfe der aus unserer Arbeitsgruppe stammenden polyklonalen Antikörper GPT 4 (4 Klone) und GPT 5 (3 Klone) identifiziert (siehe B4.1 und Anhang F5). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Klone zeigt Abb. 6, die Nucleotidsequenzen finden sich im Anhang unter F8.1. Mit dem Antikörper GPT4 wurde aus der Bank 2I ein unvollständiger, für das Keratin AbaK12 (ab Coil 1B) codierender Klon identifiziert. Aus diesem wurde eine, die komplette Tail-Domäne umfassende, ca. 300 Basen große DNA-Sonde erstellt, damit die Bank 2I durchsucht und acht entsprechende Klone gewonnen. Noch bevor diese weiter untersucht werden konnten, zeigte sich, daß bei einem vorher gestarteten „Screening“ mit GPT4 bereits zwei für das vollständige Keratin codierende Klone identifiziert wurden. Da diese bereits weiter sequenziert waren, wurden sie für die weitere Bearbeitung verwendet. Insgesamt konnten einige Klone im Verlauf der verschiedenen „Screening“-Durchgänge der einzelnen cDNA-Banken mehrfach gewonnen werden.

Die cDNA-Klone *abak13* und *abak15* ließen sich nur sehr schwer sequenzieren. Besonders im 5'-UTR mußten die Sequenzierungen öfters wiederholt werden und gingen nur in kleinen Schritten voran. Interessanterweise ordnen sich beide Keratine in einem Stammbaum auch nahe zueinander. Der Phagenklon *abaK13* codiert für ein unvollständiges Keratin. Wagt man, ausgehend vom Protein AbaK15, eine Schätzung wieviele Aminosäuren fehlen, so kommt man auf einen Wert von etwa 30. Durch die zum Teil sehr unterschiedlichen Head-Domänen ist hier aber keine endgültige Aussage möglich.

Auffällig in der Nucleotidsequenz von *abak12* ist das seltenere Polyadenylierungssignal <ATTAAA>. Es kommt, getrennt durch fünf Nucleotide, 12 und 23 bp, vor dem Poly-A-Schwanz doppelt vor <ATTAAACATTTATTAAA>.

Von den abgeleiteten Proteinen ist AbaK11 mit 456 Aminosäuren, einem pI von pH 6,08 und einer Masse von 50,3 kDa das längste Typ I-Protein und zugleich das basischste aller sequenzierten IF-Proteine. Das dazugehörige Insert weist eine Länge von 1952 Basen auf. Der 5'-UTR ist mit 24 Basen relativ klein. *abak10* weist zu *abak11* ein um 30 Basen kleineres Insert auf. Der 3'-UTR ist zwar um 40 bp größer, dafür ist aber der 5'-UTR um 59 Nucleotide kleiner. Das abgeleitete Protein AbaK10 umfaßt 451 Aminosäuren, hat eine Masse von 49,2 kD und einen pI bei pH 5,36. Bei *abak12* sieht es ähnlich aus. Der 5'-UTR ist mit 81 bp der zweitgrößte, dafür ist der 3'-UTR mit 432 und der ORF mit 1344 Basen wieder etwas kleiner. Das zugehörige Protein AbaK12 ist mit 447 Aminosäuren das drittgrößte sequenzierte Typ I-IF-Protein. Die Masse liegt bei 51,3 kDa und der pI bei pH 5,73. Dem Insert von *abak13* fehlen mit 1490 Basen auf der 5'-Seite noch einige Nucleotide um für ein vollständiges Keratin codieren zu können, ein 5'-UTR ist daher nicht vorhanden. Der 3'-UTR ist mit 211 Basen der kleinste aller sequenzierten IF-Proteine. AbaK13 ist aminoterminal nicht ganz vollständig und die Anzahl von 417 Aminosäuren, ebenso wie die Masse von 45,9 kDa, daher sehr gering. Eine Änderung des pI-Wertes von pH 4,96 ist ebenfalls zu erwarten. Von den vollständigen Typ I-Proteinen ist AbaK15 mit 429 Aminosäuren und einer Masse von 48,0 kDa das kleinste, der pI ist mit pH 5,9 aber der zweithöchste. Entsprechend ist das Insert von *abak15* mit 1586 Basen das kleinste, der ORF beträgt 1296 bp. Ähnlich klein sind die ORFs von *abak14* (1296 bp) und *abak18* (1308 bp). Da der 3'-UTR bei *abak14* aber 520 Nucleotide umfaßt, erreicht das Insert eine Größe von 1858 Basen. Das zugehörige Protein hat 431 Aminosäuren, eine Masse von 48,7 kDa und einen pI von pH 5,49. AbaK18 umfaßt 435 Aminosäuren, erreicht eine Masse von 48,5 kDa und einen pI von pH 5,09. Das dafür codierende Insert enthält 1659 bp.

## Typ I-Keratine von *Acipenser baeri*

AbaK12	-MTSFSSQNSSYSSRGPSRISSSGSGAYGSSSFSLSGGGMSGGQKAMSM-----	47
AbaK15	-MSHYSTR--SFSTRSSDGLTSRPATLMSSSRLYSS---AAPHRALST-----	42
AbaK10	MSVRTS-----TKVTQHRVGSVASVPRALSVYGGAGGRGSRISASAIYNLSSGMG	50
AbaK11	MSVHISRCPPGGSSKGSVIIQRKVGSVACAPRALSVYGGAGGRGSRIS-TSVYGPSTGIL	59
AbaK13	-----<LSLGGGGAG-----	9
AbaK18	--MSYRPGSYSVSSMRPVGS-VRSSQVMTVQSRMPLASAASV-----	39
AbaK14	MQVQRSQRFSSASMGGGGGGSIIRSGAQSSFSSMGGGMGYGMG-----	43
.		
AbaK12	-----YGGSSNVHSRISSS-SSRSYSSAGG---FQLGDAMG-----	80
AbaK15	-----YRGAGGQGTRISSA-SYMSPLSSAGGGDGFSLSSAS-----	77
AbaK10	SGGGYGSGGGFSGGGFSSGGGYG-SGGGFGSGGGYSGGGFSGGGYSMSYSAG-GMG	108
AbaK11	SG--YGSTWGHGSGGGFSSGGGFG-SGGGFGSGGGFSGGGFSGGGYSGGWGILPGGCY	116
AbaK13	-----FGGGAGFGGGAGFG-GGAGFGGGAGFGGGAGFGGG-----	44
AbaK18	-----YGGAGGRGSRISVGGSSSGFGSGLGSGAGGSYSSMSVS-----	77
AbaK14	-----GGGGMSFGMGSSSGMGFGMGGGGG-GFGFANGAGAFG-----AGGG	85
. . . . . * . .		
AbaK12	---GGFQADGKQTMINLNDRLAIYLEKVRTLEASNATLEKQIREWSQN-RSVVSSDYSAY	136
AbaK15	----SVASNGKHTMQNLNDRLATYLEKVRTLEASNATLEKQIREWYEK-KGPVLQDYSAY	132
AbaK10	GQDNLTNLNEKATMQNLNDRLATYLEKVRSLAANSKLELQIRQFYENSSPIVQRDYSAY	168
AbaK11	SQDSMTNLNEKATMQNLNDRLASYLEKVRSLAANSKLELQIRQYEHSHPVVQRDYSAY	176
AbaK13	--DVGLSLNEKATMINLNDRLAIYLEKVRTLEASNATLEKQIREWSQN-RAVITHDYSAY	101
AbaK18	--GSLVGNKETMIGLNDRLAAYLETVRNLEQANSKLEFQIREALEK-KGPTTRDLSPF	134
AbaK14	EGGSFIMGNEKQHMHELNDRLATYLEKVRTLEATNKDLEEKLRNF <sup>T</sup> TTS--KVESH <sup>D</sup> DYSAY	143
: * * ***** **.***.* * * ** : : : * * . :		
AbaK12	NATIDDLRAKIAAALNVNSGIIILHIDNAKLAADDFRVKYENELTMRMSVEADIAGLKKLL	196
AbaK15	EKTIDGLRAQISATAHENAKILLRIDNAKLAGDDFRMKYEAELAMRQSVEADIAGLRRVL	192
AbaK10	WKTIEDLNKIGAAATIDNARILLQIDNAKLAADDFGTKEYEHLMRQSVENDIANLRRLL	228
AbaK11	WKTIEELKDKINRATVDNSRILLQIDNAKLAADDFVTKEYEQELMMRQSVENDIANLRRLL	236
AbaK13	WKTIAADLRDKIGVANMTNARIILQIDNAKLAADDFRVKYENELAMRQSVEADIAGLRRLL	161
AbaK18	EKTLEDLRKKVYDMTMDNSRLVLQIDNSRLAADDFRVKFESEYSIRQSVESDIIGLRKVI	194
AbaK14	EAQLKPIRDQIINIILENARLALEMDNAKLAADDFRMKFEAEYAIRQSVENDINGLGLK	203
: : : * : : * . : : * . : : * . : : * . : : * . : : * . : :		
AbaK12	DELTLRSRDLEMQLLEGLKEELIYLKKNHEEELASCRS <sup>Q</sup> LSGQ-VQVEVDAAPGVDLAKII	255
AbaK15	DELTLARSSLETEIEGLKEELIYLKKNHEEDRRALRS <sup>Q</sup> MGGN-VNVEVDSTPGVDLTQVL	251
AbaK10	DQTTLTAKADLEMQIEGLNDELAYLKKNHQEELLALRS <sup>Q</sup> VGGT-VNVEVDAAPQQDTSRVL	287
AbaK11	EHTNLTAKADLEMQIGNLRDELAYLKKNHEEEMRALRS <sup>Q</sup> VGGT-VNVEVDAAPQQDTSRVL	295
AbaK13	DELTLARSSLEMEIEGLKEELIYLKKNHEEELLALRS <sup>Q</sup> VGGG-VNVEVDAAPQQDLRVL	220
AbaK18	DDTNMGRMNLESEIESLKEELIFIKQNHQEVNDRNQIA <sup>Q</sup> SGVQVDVDPKQD <sup>L</sup> LAQVL	254
AbaK14	KEYEFNHKTLQDIEGLKDELDFLKKNHEEELASLR <sup>S</sup> EMSGT-VSVDLQAAPAVDLQRVL	262
. . : : * : : * . : : * . : : * . : : * . : : * . : : * . : :		
AbaK12	AEIREQYENMAAK <sup>S</sup> RRDVEAWYQGVVQQVTEHTESLQSSKTEIKDLNRTLQGLQIE	315
AbaK15	AEIRSQYEGIANKNR <sup>Q</sup> EMEAWYKDKFDALNQVSSSTEALQSSKTEVSELKRTIQSLQIE	311
AbaK10	EEMRMQYEGIADKNRRDVEAWYKDKFESLNQVTSSTQAIETHRSEINDLRRTIQGLEIE	347
AbaK11	EEMRMQYEGIADKNRREVEAWYKDKFDMLSHQVTTSTQAIETSRTQINDLRRTVQGLEIE	355
AbaK13	DEMRAQYEGIAEKNRDVEAWYKDKFDLKNQVATSTEVLTQTSKSEISELRRTLQGLEIE	280
AbaK18	AEVRAQYESMAQKNRDELKAWHENKLTEVEVEVIQNTALQGARTEVTELRRQMOSLEIE	314
AbaK14	DDIRAEYEGVARRS <sup>Q</sup> EAEERWFVKQAE <sup>T</sup> KQAEVAQSTEALQSTKTEFTDLRRQYQNLQAE	322
: : * : : * . : : * . : : * . : : * . : : * . : : * . : :		

Fortsetzung und Legende nächste Seite

### Typ I-Keratine von *Acipenser baeri* (Fortsetzung)

AbaK12	LQSLHTMKQSLEANLADTNARYSAQLSHLQSVVTSLEAQLTQLRADTEHSAEEYRILLDI	375
AbaK15	LQSHLSLKEALEGTLSETEQRYAAQLQQLQSIIFRLENDLSQGREDMRRQSDDYKALLDI	371
AbaK10	LQSALSMKQAMENTLAETEARYSNMLQGYQNNINMLEAELNQVRLDTERQATDYKLLLDI	407
AbaK11	LQSVLSMRQALENTLAETEARYSCTLQGYQNTINMLEAELNQVRLDTERQAMEYKLLLDI	415
AbaK13	LQSQLSMKSALEGTLAETEGRYGAKLSHLQTIIDRLQTELMQVRMDMERQNEYKMLLDI	340
AbaK18	LESQRSMKASLEDSLDRDTEMRNNMEMERYNNMILQLEAELGQLRGNIQMQASEYEALLNI	374
AbaK14	LDALNASKSSLEQVLMDETEGRYQMQQLQOISAIVGRLLQQLMNVDRSMTAQSQEYQNLNI	382
	*:: : : ::* * :*: * :. . : *: :* : * . .. :*. **:*	
AbaK12	KTRLELEIAEYRRLLDGEDGRS-----SGMQSSTSVKTSTGTTSSSTTK	420
AbaK15	KTRLEIEIAEYRRLLDGEE--R--RAPVQRAPVVVTR-----K	404
AbaK10	KTRLEKEIATYRQLLDVEDSR-----IPTGGKQDFITTTT-----T	443
AbaK11	KTRLEKEIATYRQLLDVEAAQ-----IPTGVKDQYITTTK-----S	451
AbaK13	KTRLEMEIAEYRRLLDGEDSGKGYNSQSSQKVVVQKVEEVKAKAPVVTKTR-----M	392
AbaK18	KMKLEAEIATYRRLLDGEDFR-----LQDALVDQSSTKSI-----K	410
AbaK14	KMKLEMEIATYKLLLEGAEPG-----AVMLGGGGAGVNTSQ-----	418
	* :** *** *::**:	..
AbaK12	VVTIVEEVVGGKVVSSSSTSKSLSKPY	447
AbaK15	VKTIVEEVVNGKVVSSRVEEVEQKI--	429
AbaK10	TTNLPRPK-----	451
AbaK11	YVQVK-----	456
AbaK13	VKTMIVEEVDGVVVNTREEMVEEPM--	417
AbaK18	KVTVTQTLVDGKVVSESTNTKEIGK--	435
AbaK14	TVVITKET---KTVTT-----	431
	:	

**Abb. 6** Abgeleitete Aminosäuresequenzen der für Typ I-Keratine codierende cDNA-Klone: *abak10* bis *abak15* und *abak18*. Multiples Alignment mit ClustalX. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons *abak13* ist auf der N-terminalen Seite des Proteins unvollständig (<). In den Aminosäuresequenzen sind, wie in der Einleitung erläutert, die typischen IF-Proteindomänen nach (Conway und Parry, 1988) farblich unterschiedlich hervorgehoben. Schwarz für Head- bzw. Tail-Domäne, blau für den helikalen Bereich der Rod-Domäne, rot für die nicht-helikalen Linker. Sterne (\*), Doppelpunkte (:) und einfache Punkte (.) unter den Sequenzen zeigen die verschiedenen Konservierungsgrade der Aminosäuren an.



Die zunächst angestellte Vermutung, daß es sich um einen Sequenzierfehler handeln könnte, erwies sich als falsch. Obwohl die entsprechende Region nur äußerst mühsam und langwierig sequenziert werden konnte, zeigten die erhaltenen Daten, daß das Insert an dieser Stelle tatsächlich ein Stopcodon aufweist. Da der Vektor in seiner „Multiple cloning site“ zusätzlich noch einen Defekt in einer der normalerweise verwendeten Restriktionsschnittstellen aufwies, lag die Vermutung nahe, daß es sich bei diesem Klon (Labornamen: *8c2*) um ein Artefakt handelte.

Ich versuchte daher weitere Klone mit einem eventuell „korrekten“ Insert zu erhalten. Hierzu durchsuchte ich die Banken 2II und 3I erneut mit dem Antikörper IFA. Dabei gelang es mir tatsächlich einen Klon zu erhalten, der eine unbeschädigte Restriktionsschnittstelle aufwies (Labornamen *13b2*). Nach wiederholten Sequenzierungen zeigte sich jedoch, daß das Insert dieses Klons mit dem vorherigen vollständig identisch ist. Auch hier findet sich vor dem „8er“-Motiv in der Tail-Domäne ein Stopcodon. Um das Insert in den Banken spezifisch detektieren zu können, versuchte ich nun eine DNA-Sonde aus dem Head-Bereich zu erstellen. Dies erwies sich als äußerst schwierig, was angesichts der vielen fehlgeschlagenen Sequenzierungen nicht überraschte. Vermutlich stören bestimmte Sequenzmotive im Insert die DNA-Polymerasen.

Parallel verwendete ich eine aus dem Keratin OmyK8.1 der Regenbogenforelle erstellte DNA-Sonde. Diese erkannte auch tatsächlich Klone für ein Typ II-Keratin. Die erhaltenen Inserts für das AbaK2 Protein waren aber allesamt unvollständiger als die bereits vorhandene Sequenz. Mit einer schließlich aus der Head-Domäne erstellten DNA-Sonde durchsuchte ich die Banken 2I, 2II und 3II. Alle 27 als positiv identifizierten Plaques enthielten Inserts für AbaK8a. Bei 19 davon konnte das Insert beim Restriktionsverdau nicht herausgeschnitten werden. Sie wurden von vornherein als identisch zum Klon *8c2* angesehen und nicht ansequenziert. Weitere acht Klone konnten durch direkte Sequenzierung des 3'-Endes als identisch mit *13b2* eingestuft werden.

Da die Banken nun mehrfach ausplattiert und mit einer hochspezifischen Sonde durchsucht worden waren, ging ich davon aus, daß ein entsprechender Klon nicht enthalten ist. Im Folgenden versuchte ich mittels verschiedener RT-PCR-Methoden cDNA zu erhalten, die für ein „korrektes“ K8-Orthologes Keratin codiert. Die dafür verwendeten Primer waren zuvor bei der Herstellung der DNA-Sonden getestet worden. Als Vorlage diente RNA, die bei der Präparation der cDNA-Bank eingefroren worden war. Zusätzlich wurde aus bei -80°C eingefrorenem Lebergewebe „frische“ RNA präpariert. Alle genannten Versuche erbrachten aber keine neue cDNA und damit keine neuen Sequenzinformationen.

## Typ II-Keratine von *Acipenser baeri*

AbaK1	MSLLGSKRISISTSSLLNNRSSRSRGGSSMSQSGLYSSGQIRMSNGYSSYS--MGGSMGG	57
AbaK2	---<GG-----GFGGGYGGGMGMG-GGMGMGGGLMGGGFGGGHGGGFCGGGFGG	45
AbaK8a	-----MAYNRNSGARTFSSRSYSSPGNKMSVSRVNSAY---FPGNRTG	40
	. . . * . . . * . . . * . . . *	
AbaK1	GMRLPSIPISAVTYNNSLLA-PLNLEIDPNIQVIRSQEKEQIKGLNNRFASFIDKVRFL	116
AbaK2	GMGAP---ITAVTVNQSLLA-PLNLEIDPNIQVIRSQEKEQIKGLNNRFASFIDKVRFL	101
AbaK8a	PSGISASWATPVSSAGILLSNPPNTEIDPRFHQIKTQEKEEIKGLNNKFADFINKVRHLE	100
	. :.* : ** : * * **** . : : * : **** : **** : * . * : * . * . *	
AbaK1	QQNKMLETKWNLMQGQTTTKSNINAMFEEYIANLRRLDAINNDKSKLDSELRNMQGAVE	176
AbaK2	QQNKMLETKWNLMQGQTTTKSNINAMFEAYIANLRRLDSLNDKMKLESDLNMQNMVE	161
AbaK8a	QQNKVLETRLKIMLEKGDYKSNIDQIVAAFGNNLTSQRDRLSNDRDKLEKELARTKALVE	160
	*** . *** : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
AbaK1	DFKGKYEDEINRRTGLENDFVVLKKDVDGAFMVKADLEDKVGSLSDINFLRSIYEEELR	236
AbaK2	DFKNKYEDEINKRASVENEFVLLKKDVDGAYMNKVELEAKVDALQDEINFLRAIYEEELR	221
AbaK8a	DNKNKFEDEINRRTQLENEFVLSKKDVEGYLQKVDLENTVESLMDELAFKQLYDEEIR	220
	* . * . * : **** : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
AbaK1	EMQSQIKDTSVVVQMDNTRHLDMSIVA EVKAQYEDIAAKSREEAESWYKVKYSEMSSQA	296
AbaK2	EMQSQIKDTSVLEMDNSRNLDMDSIVA EVRAQYEDIAAKSRAEAEESWYKQKYEEMSTSA	281
AbaK8a	ELQSQINNTAVTVEMDNNRGLDMKQIV EEVKMQYEGIAVRGRDEAEQWYKKNVDDMAAEA	280
	* : * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
AbaK1	GKYSDELRLNTKGDIAELKRMIQRLESEISSIKGQRATLEAQIAEAEERGELAVKDAKARI	356
AbaK2	GQYGDDLRLNTKSEIAELNRMISRLTSEIESVKGQRGNLEAQIAEAEERGELAVKDAKARI	341
AbaK8a	GKYNQDLKGVKNEIVEMRLIQRNLNSEAEGLKNRRANLEMAIGEAEERGQLAVSDAKNRV	340
	* . * . : * : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
AbaK1	ADLEAALQKAKQDMARQVREYQELMNVKLALDIEIATYRKLLEGEEDRISN-HSVVSVHS	415
AbaK2	ADLEAALQKAKQDMARQVREYQELMNVKLALDIEIATYRKLLEGEESRISSGGGAVTVHM	401
AbaK8a	SELEAALKSAKQAMAKQVREYQDLMLNKLALDIEIATYRKLLEGEESRLGT-----HQ	393
	: : * * * * : . * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *	
AbaK1	APSYSQSSS-----KGMHAGGYS-TS	435
AbaK2	QQSVSSSGGFGMGGMGGGGGGGFGMGGGGGSGFGMGGGIGGGMGGGSMGGGYGGFS	461
AbaK8a	QGGPRQDSQ-----	402
	. . . .	
AbaK1	GGYSSSSSGIAQLRPPGTWPLRTW--	459
AbaK2	GGSSGGGGGSSKVSYSQSSTTKTKRY	487
AbaK8a	-----LSAIDQLDF-----	411
	. . : :	
AbaK8a	TPVCPAYVDGLVQSRSLDLSRAAPPKAVLIKTIETRNQVISESSHFS-	

**Abb. 8** Abgeleitete Aminosäuresequenzen der für Typ II-Keratine codierenden cDNA-Klone: *abak1*, *abak2* und *abak8a* im multiplen Alignment mit ClustalX. In den Aminosäuresequenzen sind, wie in der Einleitung erläutert, die typischen IF-Proteindomänen nach (Conway und Parry, 1988) farblich unterschiedlich hervorgehoben. Schwarz für Head- bzw. Tail-Domäne, **blau** für den helikalen Bereich der Rod-Domäne, **rot** für die nicht-helikalen Linker. Sterne (\*), Doppelpunkte (:), einfache Punkte (.) unter den Sequenzen zeigen verschiedene Konservierungsgrade der Aminosäuren an. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons *abak2* ist auf der N-terminalen Seite des Proteins unvollständig (<). Der zusätzlich gezeigte Sequenzausschnitt von *abak8a* liegt hinter dem ersten Stopcodon, aber im gleichen Leseraster. Das typische K8-Orthologen Motiv wurde mit **grün** hervorgehoben.

Der Klon *abak1* enthält mit 2506 bp das größte Insert der sequenzierten Keratine. Bedingt durch den großen 3'-UTR von 1056 Basen ist der ORF jedoch nur 1380 Nucleotide groß. Das abgeleitete Protein enthält 459 Aminosäuren und hat eine Masse von 51,3 kDa, sowie einen pI von pH 5,73. Bei *abak2* ist das Insert mit 1835 Basen bedeutend kleiner. Es fehlt jedoch der 5'-UTR und der 3'-UTR ist mit nur 345 Basen relativ klein. Der ORF enthält daher 1466 Basen und das abgeleitete Protein *AbaK2* ist mit 487 Aminosäuren das größte sequenzierte Keratin. Entsprechend hoch ist die Masse mit 51,4 kDa, der pI liegt bei pH 5,06. Das oben beschriebene Keratin *AbaK8a* hat 411 Aminosäuren, eine Masse von 46,8 kDa und einen pI von pH 5,39. Der zugehörige Klon *abak8a* weist ein Insert von 1788 Nucleotiden auf. Der ORF enthält 1236 Basen und wird von einem 5'-UTR mit 48 Nucleotiden und einem 3'-UTR mit 486 Basen flankiert.

## 5. Sequenzierung von Desmin und Vimentin

Um Phagenklone zu identifizieren, die für Desmin und Vimentin codieren, wurden die Antikörper DES (Anti-Desmin) und XV2 (Anti-Vimentin) eingesetzt (siehe B16, Tab. 2). Während das „Screening“ mit XV2 keine Ergebnisse erbrachte, identifizierte DES interessanterweise einen für Vimentin codierenden Klon. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Klone zeigt Abb. 9, die Nucleotidsequenzen finden sich im Anhang unter F8.3

Zur Identifikation von Desmin wurden DNA-Sonden aus Desmin von Katzenhai, Regenbogenforelle und Flösselhecht eingesetzt. Erst die Sonde aus Flösselhecht (1,4 kB, gesamte Rod) konnte vier Phagenklone identifizieren, die für Desmin codieren, einer davon enthielt ein unvollständiges Desmin (ab Coil 1A). Die daraus gewonnenen Informationen wurden zur Erstellung von Primern für die Sequenzierungen verwendet. Die doppelsträngige Sequenzierung erfolgte jedoch stets mit dem „vollständigen“ Klon.

Im Verlauf des „Screenings“ mit dem Antikörper IFA konnten insgesamt noch weitere drei für Vimentin und sieben für Desmin codierende Phagenklone erkannt werden. Während die Klone für Vimentin (Bank 2I) alle für ein vollständiges Protein codieren, fehlten bei vier der Phagenklone für Desmin (Bank 2II und 3I) Nucleotide für den Head-Bereich. Sowohl Desmin als auch Vimentin konnten Proteinflecken in der 2D-PAGE zugeordnet werden.

Das abgeleitete Protein *AbaD* umfaßt 461 Aminosäuren, hat eine Masse von 53,0 kDa und einen pI von 5,38. Der codierende Klon enthält ein Insert von 2145 Basen. Dem relativ großen 3'-UTR mit 700 Basen steht ein ORF mit 1386 Nucleotiden gegenüber. Der 5'-UTR beinhaltet 40 bp. Das abgeleitete Protein *AbaV* hat eine Masse von 52,9 kD und einen isoelektrischen Punkt von 5,12. Das Polypeptid umfaßt 455 Aminosäuren. Der dafür codierende Klon *abaV* beinhaltet ein Insert von 1833 Basen. Mit 1368 Nucleotiden ist der ORF ähnlich groß wie bei *abaD*. Der 3'-UTR ist mit 375 bp jedoch nur fast halb so groß. Der 5'-UTR umfaßt 72 Nucleotide.

Typ III-IF-Proteine von <i>Acipenser baeri</i>		
AbaV	MS---TMNRQSSSYKRMFGG---ERPAVSTRSYSSR-QYSSPIRSRVSYTSHSAPTLYAT	53
AbaD	MSQSYSSSQRASSYRRTFSGGAAASPQFSRASYSRSGAGSATSASRVYQVSKSS---ASP	57
	** : .:::***:* *** * . * ***** *: . *** .*:*: :.	
AbaV	KSSSTRLRSSAPQTRLLSETLDFALSDAINTEFKANRTNEKAEMQHLNDRFASYIDKVR	113
AbaD	SFSSYRASRVAPLRVYGGETLDFSLADAMNQEFLOTRTNEKAELQHLNDRFVNYIEKVR	117
	. ** * ** .*****:***:* ** .*****:*****..*:***	
AbaV	LEQQNKILMAELEQLKKGKTTKIGDLYEDEMRELRRQVDKLTNEKARVEVDRDNLGDDIN	173
AbaD	LEQQNQTLVVEIERLKGREPTRVAEIIYEEEMRELRRQVDILTNRGRVEVERDNLADDLQ	177
	*****: *:.*:*:***: .*::.:***:***** *****:*.***:***.***:	
AbaV	RLREKLQEEAIQREEAESTLHSFRQVDNASLARLDLERKVESLQEEIAFLRKLHDEELA	233
AbaD	KIKQRFQEEIQKEDAENNLAAFRADVDAATLARIDLERRIESLQEEIAFLRKIHDEEIL	237
	:.:::*** *:***.* :** *** *:***:*****:*****:***:***:	
AbaV	ELQVQIQEQHIQIDMDVAKPDLTAALRDVRLQYENLASKNMSESEDWYKSKFADLTEAAS	293
AbaD	ELQAQLQETHVQVEMDMSKPDLAALKDIRSQYENIAAKNIQEAEEWYKSKVTDLTQAAS	297
	***.*:* *:.*:*:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:	
AbaV	RNSEALRQAKQDCNDYRRQVQGLTCEVDALKGTNESLERQMHEMEENFALESSNYQDSIA	353
AbaD	KNNDALRQTKQEMMEYRHQIQSYTCEIDSLKGTNDSLMRQREMEERFSGEASGYQDNIS	357
	*:.:***:***: :***:*. ***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:	
AbaV	RLEDDIRNMKDEMSRHLREYQDLLNVKMALDIEIATYRKLLERGEESRIITPMPNFSSLNL	413
AbaD	RLEAEIANMKDEMARHLREYQDLLNVKMALDVEIATYRKLLERGEENRVSLPIQSFSSLSF	417
	*** :* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*.*:*.***:*	
AbaV	RETSLEMRPVMMDTISRK--VLIKTVETQDGHVINEMTQEHDDE	455
AbaD	RETS PGQHQRKSEVHSHKSVVIKTIETRDGEVVSESTQQQHDSI	461
	**** : . : * *****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:	

**Abb. 9** Abgeleitete Aminosäuresequenzen der für die Typ III-IF-Proteine Desmin und Vimentin codierenden cDNA-Klone *abaD* und *abaV* im multiplen Alignment mit ClustalX. In den Aminosäuresequenzen sind, wie in der Einleitung erläutert, die typischen IF-Proteindomänen nach (Conway und Parry, 1988) farblich unterschiedlich hervorgehoben. Schwarz für Head- beziehungsweise Tail-Domäne, blau für den helikalen Bereich der Rod-Domäne, rot für die nicht-helikalen Linker. Sterne (\*), Doppel-punkte (:), und einfache Punkte (.) unter den Sequenzen zeigen verschiedene Konservierungsgrade der Aminosäuren an.

## 6. Ein Typ V-IF-Protein, Lamin B

Im Verlauf des Screenings der Bank 2II gelang es „nebenbei“ einen für ein Lamin codierenden Phagenklon zu isolieren. Die Detektion erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper IFA der im Säuger ein breites Spektrum an IF-Proteine erkennt.

Der Klon enthält ein Insert von 3939 bp; bemerkenswert daran ist der sehr große 3'-UTR mit 2094 Nucleotiden. Auffällig an der Nucleotidsequenz ist die Größe des Inserts mit 3939 bp. Der 3'-UTR

übertrifft mit 2094 bp den ORF mit 1773 Nucleotiden deutlich. Das abgeleitete Protein umfaßt 590 Aminosäuren und ist damit das größte bisher beim Stör sequenzierte IF-Protein (Abb. 10).

Es zeigt die für Lamine typische Erweiterung des 1B-Coils um 42 Aminosäuren. Mit einer Masse von 68,2 kDa ist das Lamin deutlich größer als IF-Proteine vom Typ I-III. Der pI liegt bei pH 5,98. Auffällig ist die im Vergleich zu den Keratinen sehr große Tail-Domäne mit 196 Aminosäuren. Wie für ein Lamin zu erwarten zeigt die Sequenz große Übereinstimmungen mit den IF-Proteinen der Protostomier. Ebenso wie diese beinhalten sie eine 42 Aminosäuren große Insertion im 1B-Coil der Rod-Domäne (schwarz unterstrichen) und im Tail eine Insertion von etwa 105 Aminosäuren. Diese tritt bei den cytoplasmatischen IF-Proteinen der Deuterostomier nicht auf.

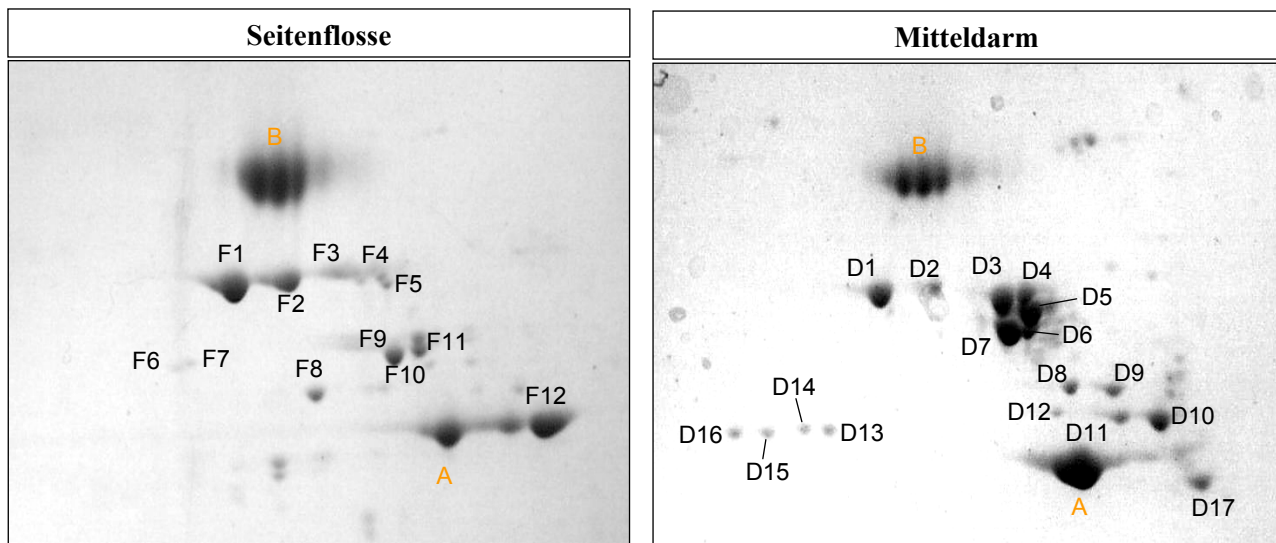
Typisch für ein Lamin ist das violett hervorgehobene konservierte Sequenzmotiv hinter dem Ende der Rod-Domäne aus vier basischen Aminosäuren mit einem ersten konservierten Lysin. Dieses Motiv stellt das Signal für die Kernlokalisierung des Proteins und kommt bei den cytoplasmatischen IF-Proteinen nicht vor. Ebenso wie die CaaX-Box am Ende der Sequenz (orange hervorgehoben). Untypischerweise endet sie beim Stör nicht mit einem Methionin, was bisher nur beim Xenopus-Lamin LIII<sub>b</sub> gefunden wurde. Kennzeichnend für ein Lamin der Vertebraten ist ein Cluster aus sauren Aminosäuren vor der CaaX-Box (grün markiert).

Vergleiche mit Lamin-Proteinen anderer Organismen aus Protein-Datenbanken zeigten, daß es sich bei dem entdeckten Klon wahrscheinlich um ein Lamin vom B<sub>3</sub>-Subtyp handelt.

	1	11	21	31	41	
1	MASMPSTPA	SSGRSTRRST	GVGVPAGSG	SSPTRLSRLQ	EKEELRQLND	50
61	<u>RLANYIERVR</u>	<u>SLETDKASLQ</u>	<u>LLLEDREQSS</u>	<u>SREMGKIRLL</u>	<u>YETELADARK</u>	100
101	<u>LLDNTANERA</u>	<u>RLQLQFSKVT</u>	<u>EDHRQLQIRY</u>	<u>NKKETDLAAA</u>	<u>VGRLRNLEAL</u>	150
151	<u>LNSKEAELAN</u>	<u>LLAENRRLES</u>	<u>ELFELKAQTA</u>	<u>NLESVLHDVK</u>	<u>KQLHDEMLQR</u>	200
201	<u>VDLENQMOTL</u>	<u>REQMEFQKHI</u>	<u>GEEELRETKS</u>	<u>RLETRLVEID</u>	<u>SGRQKEFDSK</u>	250
251	<u>FFEAMQQLRR</u>	<u>EHEGQIQQYK</u>	<u>EELERNFTAK</u>	<u>LENAQHAAAK</u>	<u>NSDFASSARE</u>	300
301	<u>ELMGSKMRLE</u>	<u>TLSSQLGHYQ</u>	<u>EQNVALETKL</u>	<u>REAEDALDRE</u>	<u>REISHRRLTE</u>	350
351	<u>KDREMTEMRR</u>	<u>QMOTQLEEYE</u>	<u>HLLDVKLALD</u>	<u>MEINAYRKML</u>	<u>EGEEQRLNLS</u>	400
401	<u>PSPAQRTAVS</u>	<u>RTWKLRGKKR</u>	<u>KLVEQTSEAP</u>	<u>RYKISQHSSS</u>	<u>SGPVSVDELD</u>	450
451	<u>LEGNFVKLRN</u>	<u>NSEEDQPLGG</u>	<u>WMLKRNLLSV</u>	<u>SDVVYKFPSR</u>	<u>FVLRSGQTVT</u>	500
501	<u>IWASNTGVSP</u>	<u>NPPSDLVWKS</u>	<u>ETTWGTGDNI</u>	<u>RIVLMNSNKE</u>	<u>EIAERTLVRI</u>	550
551	<u>LREAEGESEE</u>	<u>EEYDEEDVTG</u>	<u>SEVHLRRQPK</u>	<u>RRKKKCSIS</u>		590

**Abb. 10** Abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons *abaLaB*. Der 3939 bp große Klon beinhaltet ein offenes Leseraster für ein 590 Aminosäuren langes Polypeptid mit einer errechneten Molekülmasse von 68,2 kDa, sowie einem theoretischen pI von 5,98. Die Einteilung in die verschiedenen Domänen der IF-Proteinsequenz durch Farbmarkierungen erfolgte, wie in der Einleitung erläutert, nach (Conway und Parry, 1988). Blau unterstrichen wurde der für Lamine typische Einschub von 42 Aminosäuren im 1B-Coil. Violett markiert ist das Kernlokalisierungssignal. Schwarz unterstrichen wurde die ~105 Aminosäureinsertion in der Tail-Domäne. Der Vertebraten-typische Cluster aus sauren Aminosäuren wurde mir grün hervorgehoben. Das terminale CaaX-Motiv wurde mit orange markiert.

## 7. Zuordnung der sequenzierten IF-Proteine durch MALDI-MS



**Abb. 11** Für MALDI-MS-Analyse ausgewählte Proteinflecke aus der 2D-PAGE von Cytoskelettpräparationen von Seitenflosse und Mitteldarmgewebe. Die Proteine sind nach der Größe (2. Dimension, SDS, von oben nach unten) und nach der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension, IEF, von links nach rechts) aufgetrennt. Markerproteine sind BSA (B) und  $\alpha$ -Aktin (A). Die Hauptproteine der Seitenflosse (F) und Mitteldarm (D) wurden nummeriert und nach tryptischem Verdau mit MALDI-MS untersucht.

Um die ermittelten Sequenzen von *Acipenser baeri* mit den biochemisch als IF-Proteine identifizierten Flecken der 2D-PAGE in Beziehung zu setzen, wurde eine MALDI-MS Analyse der betreffenden Proteine durchgeführt. Die dafür ausgewählten Hauptproteine der Cytoskelettpräparation von Seitenflosse und Mitteldarm sind in Abb. 11 zu sehen.

Frühere Auswertungen von MALDI-MS-Analysen, z.B. von der Regenbogenforelle (Haberkamp, 1999), hatten gezeigt, daß Proteinflecken, die in der 2D-PAGE eine ähnliche Masse haben und in einer Linie wandern relativ häufig isoelektrische Varianten voneinander darstellen. Daher wurden vor dem direkten Vergleich der Sequenzen mit den Daten der MALDI-MS-Analyse die Spektren jeweils einer Präparation miteinander verglichen. Tatsächlich konnten so bereits im Vorfeld von mehreren Proteinflecken zahlreiche, vermutlich isoelektrische Varianten, aufgedeckt werden (einzelne Daten siehe Anhang F7). Tab. 4 zeigt diejenigen Proteinkandidaten, die auf Grund dieses Vergleichs wahrscheinlich identisch sind. Die Identitätsgruppe 9 (D13-D16) konnte nur in einer Präparation von Mitteldarmgewebe gefunden werden. Die Proteinflecke F8, F10, F12 und D12 konnten keiner solchen Gruppe zugeordnet werden.

**Tab. 4** Identitätsgruppen der Proteinflecke einer 2D-PAGE aus Cytoskelettpräparationen von Seitenflosse (F), Mitteldarmgewebe (D) und Magen (M) auf Grund von MALDI-MS-Spektren.

Identitätsgruppe	Proteinflecken	Molekülmasse im Gel in kDa (geschätzt)	Isoelektrischer Punkt im Gel pH (geschätzt)	CKBB-Tests und Immunoblot
1	F1, F2, F3, F4, F5	57	5,6 - 6,3	II <sub>E</sub>
2	F6, F7	50	6,5 - 6,7	I <sub>E</sub>
3	F9, F11	50	5,5 - 5,7	I <sub>E</sub>
4	D1, D2	57	6,0 - 6,3	II <sub>E</sub>
5	D3, D4	56	5,7 - 5,8	II <sub>S</sub>
6	D5, D6, D7	53	5,6 - 5,8	Desmin
7	D8, D9	48	5,5 - 5,2	I <sub>S</sub>
8	D10, D11, D17	45	5,0 - 5,2	I <sub>S</sub>
9	D13, D14, D15, D16	45	6,5 - 7,0	I <sub>S</sub>

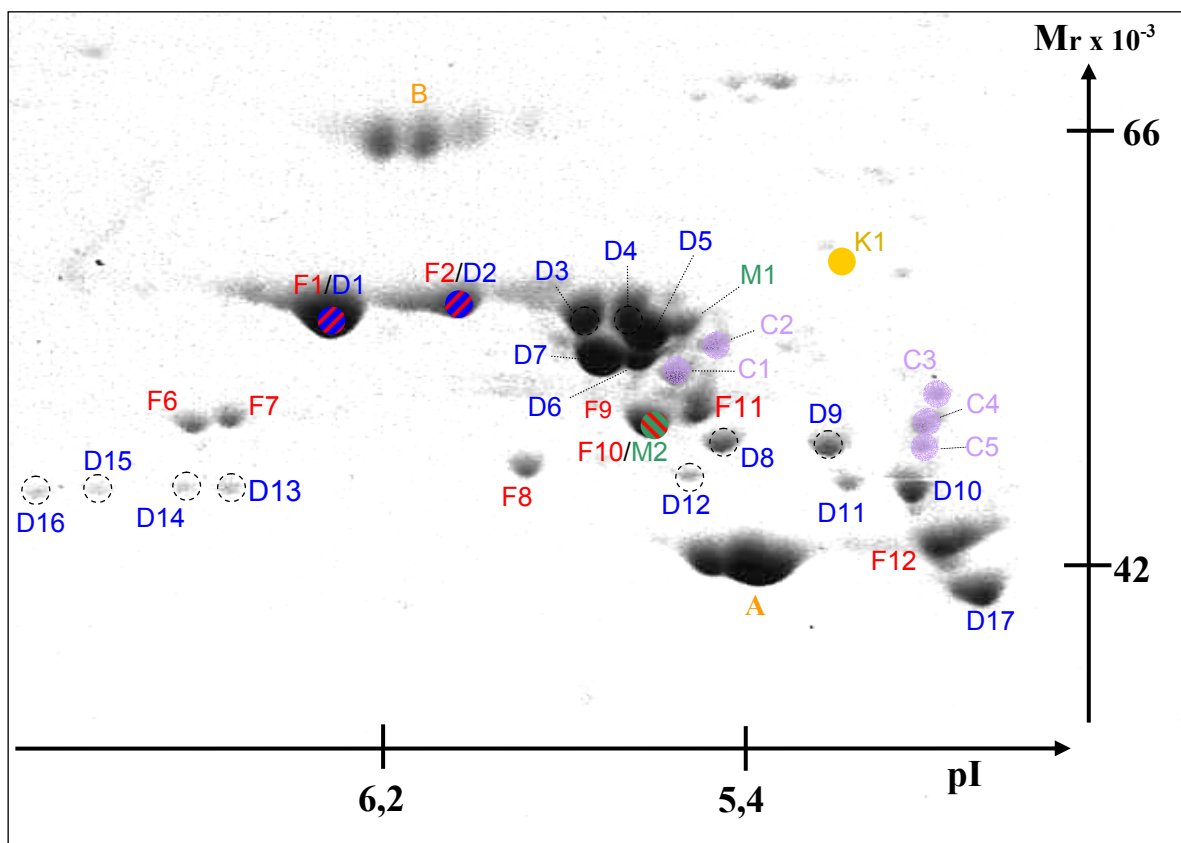
Die Daten des theoretischen tryptischen Verdaus der abgeleiteten Proteine wurden danach gezielt mit jeweils einem Vertreter dieser Identitätsgruppen verglichen. Konnten genügend Übereinstimmungen gefunden werden, wurden alle Vertreter eines solchen Clusters untersucht. Bei Peptidfragmenten, die Methionine enthalten, wurde fakultativ auch die Masse des oxidierten Schwefels berücksichtigt (Fragmentmasse + ~16). Die meisten Entsprechungen traten bei den Massen komplett gespaltenen Fragmente auf, d.h. in diesen Fragmenten war keine tryptische Spaltstelle mehr enthalten. Daneben gab es auch Übereinstimmungen von Massen bei Fragmenten, die nicht komplett gespalten wurden, bei denen also eine, zwei oder in seltenen Fällen auch drei Spaltstellen für Trypsin übersprungen wurden.

Um als identisch zu gelten, durften die Differenzen zwischen den Vergleichswerten den Wert 0,2 nicht überschreiten (Wilkins und Williams, 1997b). Die maximal mögliche prozentuale Abweichung für ein kleines Oligopeptid mit einer Masse von 650 Da liegt dann bei 0,03%. Tatsächlich wurde aber bei fast allen passenden Fragmentmassen, die im Bereich zwischen 650 Da und 3600 Da lagen, eine Differenz von 0,1 und weniger beobachtet.

Proteinflecken der beiden Gewebe die mit dieser Methode nicht zugeordnet werden konnten wurden dann gezielt untereinander verglichen. Es konnten jedoch keine weiteren Übereinstimmungen gefunden werden. Hingegen konnte bei den Proteinflecken, denen eine Sequenz zugeordnet worden war gezeigt werden, daß die Identitätsgruppen 1 und 4 identisch sind. Dies bestätigt die biochemisch gewonnenen Daten. Bereits dort hatte sich gezeigt, daß in der Mitteldarmpräparation Typ II<sub>E</sub>-Keratine vorlagen, wie sie auch im CKBB-Test von Seitenflossengewebe gefunden wurden

Um die Sequenz von Vimentin einem Proteinfleck zuordnen zu können, wurde ein weiteres 2D-Gel einer Körperwandpräparation (nicht abgebildet) verwendet. Es wurde nur ein einzelner Proteinfleck analysiert, bei dem Vimentin im Immunoblot nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 5) und mit K1 bezeichnet. Dem Punkt konnte dann auch die Sequenz von Vimentin zugeordnet werden. Außerdem wurden aus einem 2D-Gel einer Magenpräparation zwei weitere Proteinflecken untersucht (M1 und M2). Beide Flecken konnten bereits bekannten Proteinen zugeordnet werden (siehe Tab. 5). Gleiches gilt für fünf Proteinspots einer Koelektrophorese (C) von Seitenflosse und Mitteldarm. Alle fünf sind identisch und repräsentieren Desmin. Vermutlich stellen sie Abbauprodukte dar.

Die an dieser Stelle zusätzlich aufgeführten Proteinspots sowie die bereits benannten Flecken der Seitenflossen- und Mitteldarmpräparation sind in Abb. 12 zusammengefasst.



**Abb. 12** Schematische Darstellung aller bisher mit MALDI-MS untersuchten Proteinspots (außer F3, F4 und F5) an Hand einer 2D Koelektrophorese von Seitenflosse und Mitteldarm des Störs *Acipenser baeri*. In der ersten Dimension erfolgte eine isoelektrische Fokussierung (IEF), in der zweiten Dimension eine SDS-PAGE. Markerproteine:  $\alpha$ -Aktin (A) und Bovine Serum Albumin, BSA (B). Untersuchte Proteinflecken: Seitenflossen (●), Mitteldarm (●), Magen (●), Körperwand (●) und Koelektrophorese (s.o.) (●). Schraffierte Punkte (⊗) stellen identische Proteinflecken zweier verschiedener Gele dar. Umrandeten Punkten (⊙) konnten bisher keine Sequenzen zugeordnet werden. Auf die Darstellung von F3, F4 und F5 wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet, sie befinden sich direkt oberhalb der Punkte D3 und D4, sind mit diesen aber nicht identisch.

Die Tabelle Tab. 12 im Anhang F7 gibt einen Überblick über die Anzahl der praktischen ermittelten Massen pro Proteinfleck. Zusätzlich wurde die Anzahl und der prozentuale Anteil der zugeordneten theoretischen Massen angegeben. Die hier abgebildete Tabelle gibt eine kurze Übersicht über die bisher zugeordneten Proteinflecken und ihrer codierenden Sequenzen. Mit „Anzahl der identischen Massen“ werden alle Treffer innerhalb des theoretischen tryptischen Verdaus der Sequenz bezeichnet. Die „Anzahl spezifischer Massen“ sind all jene, die bei allen zugeordneten Sequenzen nur in der betreffenden codierenden Sequenz gefunden werden konnten.

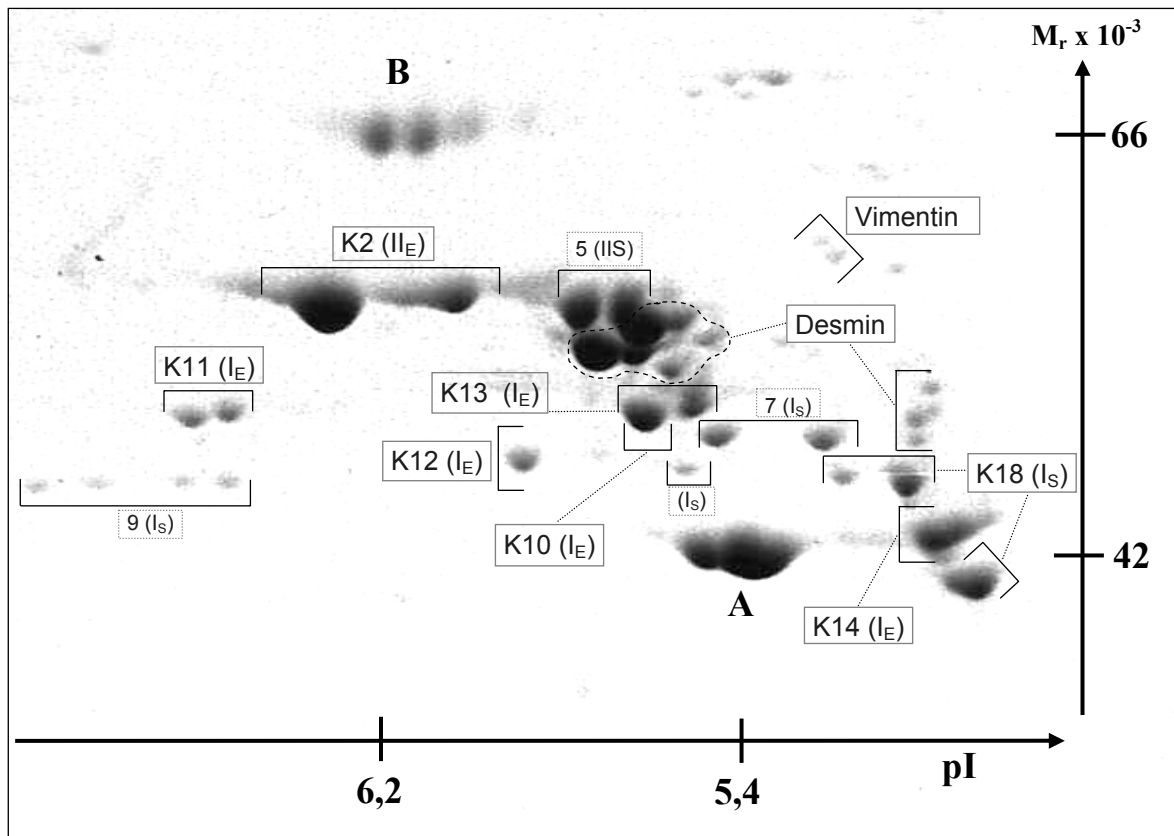
**Tab. 5** Massenspektrometrische Identifizierung der abgeleiteten Proteinsequenzen von Keratinen, Vimentin und Desmin. Den Polypeptidsequenzen AbaK13 und AbaK2 fehlt aufgrund unvollständiger cDNA-Klone ein Teil der Head-Domäne. Die Nummern der Identitätsgruppen beziehen sich auf Tab. 4. „Spezifische Massen“ konnten nur beim theoretischen tryptischen Verdaus des entsprechenden abgeleiteten Proteins gefunden werden.

Proteinflecke(n)	Identitätsgruppe(n)	Abgeleitetes Protein	Anzahl identischer Massen	Anzahl spezifischer Massen	CKBB-Tests und Immunoblot
F1, F2, F3, F4, F5, D1, D2	1, 4	AbaK2	40	35	II <sub>E</sub>
F6, F7	2	AbaK11	35	23	I <sub>E</sub>
F8		AbaK12	27	19	I <sub>E</sub>
F9, F11	3	AbaK13	40	24	I <sub>E</sub>
F10, M2		AbaK10	32	19	I <sub>E</sub>
F12		AbaK14	29	26	I <sub>E</sub>
D5, D6, D7, M1	6	AbaDes	42	39	Desmin
D10, D11, D17	8	AbaK18	46	41	I <sub>S</sub>
K1		AbaVim	20	18	Vimentin

## 8. Katalog der sequenzierten IF-Proteine

Die Koelektrophorese der Cytoskelettpräparationen von Seitenflosse und Mitteldarm zeigt alle sequenzierten Keratine und Typ III-Proteine von *Acipenser baeri*, deren biochemische Identität durch die vorliegenden Analysen geklärt werden konnte (Abb. 13).

Drei Sequenzen aus *abak1*, *abak8a* und *abak15* konnten bisher keinem Proteinfleck zugeordnet werden. Umgekehrt konnte für vier Proteine des Mitteldarms, repräsentiert durch die Spots D3/D4, D8/D9, D12 und D13-D16 keine codierende Sequenz zugeordnet werden. Tabelle Tab. 6 gibt eine Übersicht über alle bisher beim Sibirischen Stör *Acipenser baeri* sequenzierten IF-Proteine. Zusätzlich sind die wichtigsten Daten der Proteine und der für sie codierenden Klone aufgeführt.



**Abb. 13** Zur Darstellung aller bisher zugeordneten Sequenzen der Keratine und Typ III-Proteine von *Acipenser baeri* dient eine 2D-Koelektrophorese der Cytoskelettpräparationen von Seitenflosse und Mitteldarm. Ziffern (Kx) in Kästchen geben das zugehörige abgeleitete Protein an, die runden Klammern daneben den Keratin-Typ. Proteinflecken, denen noch keine codierenden Sequenzen zugewiesen werden konnten wurden, soweit vorhanden, mit der Nummer der Identitätsgruppe (siehe Tab. 4) und dem Keratintyp versehen.

**Tab. 6** Auflistung aller von *Acipenser baeri* isolierten cDNA-Klone, die für ein IF-Protein codieren. Die cDNA-Klone *abak13* und *abak2* enthalten nicht die für das vollständige IF-Protein codierende DNA-Sequenz. Werte dieser Klone, die vom theoretisch vollständigen Klon beziehungsweise Protein abweichen, sind *kursiv* angegeben. Die Anzahl der Nukleotide des 3'-UTR ist ohne die des Poly-A-Schwanzes angegeben.

Klon EMBL Accession- Nummer	Länge (bp)	Länge 5'-UTR ORF 3'-UTR (bp)	G/C-Gehalt Codierend/ Gesamte Sequenz (%)	Abgeleitetes Polypeptid  Anzahl der Aminosäuren	Masse (Da)  pI	Typ	Bemerkung
<i>abak10</i>	1919	64 1356 479	56 51	AbaK10 451	49219,6 5,36	I <sub>E</sub>	
<i>abak11</i>	1952	24 1371 538	57 52	AbaK11 456	50298,3 6,08	I <sub>E</sub>	
<i>abak12</i>	1876	81 1344 432	55 49	AbaK12 447	48704,1 5,49	I <sub>E</sub>	
<i>abak13</i>	1490	-- 1256 211	56 52	AbaK13 417	45924,9 5,00	I <sub>E</sub>	unvollständiger Klon
<i>abak14</i>	1858	25 1296 520	58 55	AbaK14 431	46759,3 5,07	I <sub>E</sub>	
<i>abak15</i>	1586	29 1290 249	57 53	AbaK15 429	48054,7 5,90	I <sub>E</sub>	im Gel nicht zugeordnet, vermutlich I <sub>E</sub>
<i>abak18</i>	1659	86 1308 247	58 56	AbaK18 435	48486,4 5,09	I <sub>S</sub>	
<i>abak1</i>	2506	52 1380 1056	56 49	AbaK1 459	51317,5 5,73	II <sub>E</sub>	im Gel nicht zugeordnet, vermutlich II <sub>E</sub>
<i>abak2</i>	1835	-- 1466 345	58 54	AbaK2 487	51423,6 5,06	II <sub>E</sub>	unvollständiger Klon
<i>abak8a</i>	1788	48 1236 486	52 48	AbaK8a 411	46807,5 5,39	II <sub>S</sub>	Stop-Codon vor K8- Motiv, im Gel nicht zugeordnet
<i>abad</i>	2145	40 1386 700	57 51	AbaD 461	53028,9 5,33	III Des	
<i>abav</i>	1833	72 1368 375	50 46	AbaV 455	52875,9 5,12	III Vim	
<i>abalab</i>	3939	54 1773 2094	49 42	AbaLaB 590	68214,5 5,98	V La-B	Langer 3'-UTR, im Gel nicht zugeordnet

## D Diskussion

### 1. Die IF-Proteine des Störs *Acipenser baeri*

Mit dieser Arbeit werden die IF-Proteine eines Vertreters der Störe, dem Sibirischen Stör *Acipenser baeri* erstmals vorgestellt. Zu Beginn meiner Arbeit lagen noch keinerlei Informationen über das Vorkommen von Intermediärfilamenten und deren Verteilungsmuster bei Stören als einer der stammesgeschichtlich ältesten Gruppe der Knochenfische (Romer und Parsons, 1983).

Wie in der Einleitung geschildert, existieren bei höheren Wirbeltieren zahlreiche IF-Proteine. Diese zeigen bei den Tetrapoden, den Agnathen und Elasmobranchiern ein typisches Expressions-Grundmuster. Wie Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, weisen die bisher untersuchten Teleosteer ein anderes Grundmuster auf (Markl und Franke, 1988; Markl, 1991; Conrad et al., 1998).

Beim ebenfalls in unserem Labor untersuchten Flösselhecht fand sich ein Verteilungsmuster, wie es bei den höheren Tetrapoden auftritt (Kusche, 1999; Bremer, 2001). Der Stör scheint aber einen Zwischenzustand aufzuweisen.

Vimentin konnte durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie eindeutig in mesenchymal abgeleiteten Geweben nachgewiesen werden. Dies entspricht der Situation bei terrestrischen Vertebraten. Der Antikörper Vim14.13, der im Blot spezifisch Vimentin erkannte, dekorierte mehrfach die entsprechenden Zellen.

#### 1.1 Werden Keratine beim Stör auch mesenchymal exprimiert?

Zusätzlich fanden sich aber auch starke Hinweise, daß in mesenchymalen Zellen Keratine exprimiert werden, was ähnlich dem Muster der Teleosteer wäre. Leider sind die Daten hier nicht ganz so eindeutig wie beim Vimentin. So dekorierte der polyklonale Antikörper GPT5 häufig nicht nur Epithelien, sondern auch andere Strukturen von vermutlich mesenchymalem Ursprung. Ob es sich dabei um eine Reaktion mit Keratinen oder nur um unspezifische Kreuzreaktionen handelte, läßt sich nicht eindeutig bestimmen. Der Antikörper 79.14 zeigte eine eindeutigere Reaktion mit mesenchymalen Geweben. So dekorierte er im Magen die Lamina propria, nicht aber das Mucosaepithel. Außerdem reagierte er in der Milz mit dem Bindegewebe und einzelnen Zellen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Fibroblasten handelt. Zusätzlich dekorierte er in der Leber anscheinend das Bindegewebe der Gallengänge.

Das der Antikörper hier mit dem auskleidenden Endothel reagiert hat, ist wegen der Nähe der Strukturen theoretisch möglich, jedoch schienen die Färbungen im Mikroskop ganz im Bereich des Bindegewebes zu liegen. Ebenfalls in der Leber zeigte sich eine schwache Reaktion mit dem Endothel der Blutgefäße. Da dieses aber durch die Präparation häufig abgerissen war, konnten hier nur sehr schwache Fluoreszenzen beobachtet werden. In der Milz dekorierte der Antikörper Bindegewebe und einzelne Zellen, bei denen es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Fibroblasten handelte. Die Daten vom Antikörper 79.14 wurden durch den Antikörper 164.4 ergänzend gestützt. Beide monoklonale Antikörper wurden gegen das *Xenopus*-Keratin xK1,8 hergestellt, erkennen aber unterschiedliche Antigene (Fouquet, 1991). Der Antikörper 164.4 färbte im Magen ebenfalls die Lamina propria und in der Leber das Bindegewebe der Gallengänge. Eine entgegengesetzte Reaktion zeigte der monoklonale Anti-Keratin-Antikörper 68.4, der auch in mehrschichtigen Epithelien positiv war. Er dekorierte im Magen das Mucosaepithel, aber nicht die Lamina propria. Dies widerspricht aber nicht den obigen Ergebnissen, da der Antikörper gegen das *Xenopus* Keratin xK18 hergestellt wurde und andere Keratine erkennt.

Ein weiteres Indiz für die Expression von Keratinen in mesenchymalen Geweben ist das nur im Mitteldarm vorkommende Typ I<sub>S</sub>-Keratin (Identitätsgruppe 9). Um Keratine auch mit biochemischen Methoden in mesenchymal abgeleiteten Geweben finden zu können, wurde die Milz präpariert. Die hier gewonnenen Daten ließen aber keine klare Aussage zu. Auf eine Präparation der Ovarien wurde verzichtet, da es hier nicht gelungen war Schnitte anzufertigen. Ohne Daten der Immunfluoreszenzmikroskopie aber wäre es nicht möglich, die gefundenen Keratine eindeutig den Ovarien zuzuordnen. Sie könnten auch aus Oocyten stammen. Zusammengefaßt ergibt die Anzahl und Qualität der Hinweise dennoch eine starke Indikation für mesenchymal exprimierte Keratine.

## 1.2 Identifikation der verschiedenen IF-Proteintypen

Erwartungsgemäß zeigte die biochemische Analyse der Keratine von *Acipenser*, daß sie wie bei den anderen Wirbeltieren in Typ I und Typ II eingeteilt werden können. Die von den terrestrischen Vertebraten bekannten abgeleiteten Eigenschaften und synonym verwendeten Begriffe „basisch“ und „größer“ für Typ II-Keratine beziehungsweise „sauer“ und „kleiner“ für Typ I-Keratine (Eichner et al., 1984; Bader et al., 1988) treffen beim Stör jedoch nicht zu. Zwar sind die biochemisch identifizierten Typ I-Keratine etwas kleiner als die Typ II-Keratine, jedoch liegen sie so dicht beieinander, daß eine solche Einteilung nicht sinnvoll ist. Für Keratine, denen bisher noch keine Proteinflecken zugeordnet werden konnten, zeigen die abgeleiteten Daten, daß auch sie vermutlich innerhalb dieses engen Rahmen liegen.

Die Typ I und Typ II-Keratine haben auch ähnliche pI-Werte, wobei das Spektrum der Typ I-Keratine größer ist. Eine Ausnahme bildet das Typ I<sub>S</sub>-Keratin, das nur im Mitteldarm vorkommt. Mit einem pI von pH 6,5-7,0 ist es das „basischste“ bisher identifizierte Keratin des Störs. Die Ergebnisse der einleitend aufgeführten Organismen lassen die Vermutung zu, daß die oben beschriebenen Eigenschaften der Keratine sich erst innerhalb der höheren Vertebraten entwickelt haben.

Die in Anlehnung an den Keratin-Katalog der Säuger (Moll et al., 1982) eingeführten Bezeichnungen „E“ für epidermale und „S“ für einfach epitheliale Keratine bei Teleostern (Markl et al., 1989; Conrad et al., 1998) (Schaffeld et al., 1998) konnten auch beim Stör verwendet werden. Insgesamt wurden so vier Keratin-Subtypen unterschieden: **I<sub>E</sub>, I<sub>S</sub>, II<sub>E</sub> und II<sub>S</sub>**.

An Hand ihrer exklusiven Expression in einem bestimmten Epitheltyp konnten die meisten Stör-Keratine den jeweiligen Subtypen einwandfrei zugeordnet werden.

### 1.3 Die Ergebnisse der MALD-MS-Analysen

Die Auswertung des MALDI-MS-Analysen zeigte, daß bedeutend weniger verschiedene Keratine im Stör vorkommen, als es der Blick nur auf die Anzahl der Proteinflecken im 2D-Gel vermuten läßt. Durch die Zuordnung der einzelnen Spots zu den Identitätsgruppen beziehungsweise Sequenzen reduziert sich die Zahl der biochemisch identifizierten Keratine auf elf, zuzüglich Desmin und Vimentin (d.h. 13 IF-Proteine aus insgesamt 34 untersuchten Proteinflecken der Koelektrophorese von Seitenflosse und Mitteldarm). Zusammen mit den drei nicht zugeordneten sequenzierten Keratinen ergibt sich eine Anzahl von vierzehn nun bekannten Keratinen beim Stör *Acipenser baeri*. Dazu kommen noch Desmin und Vimentin sowie ein Lamin, so daß insgesamt 17 verschiedene IF-Proteine bekannt sind.

Es gibt fünf Typ I<sub>E</sub>-Keratine denen jeweils eine Sequenz zugeordnet werden konnte (K10 bis K14).

Ein Typ II<sub>E</sub> (K2) und vier Typ I<sub>S</sub>-Keratine, von denen aber nur einem eine Sequenz zugeordnet werden konnte (K18). Daß dem Typ I<sub>S</sub>-Keratin, welches nur im Mitteldarm vorkommt (D13, D14, D15, D16; Identitätsgruppe 9), keine Sequenz zugeordnet werden konnte, überrascht nicht: Für die Erstellung der cDNA-Bank wurde kein Mitteldarmgewebe verwendet.

Den biochemisch identifizierten Typ II<sub>S</sub>-Proteinflecken (D3 und D4; Identitätsgruppe 5) konnte bisher keine Sequenz zugeordnet werden.

Zwar existiert mit dem Klon *abak8a* wahrscheinlich die Sequenz eines Typ II<sub>S</sub>-Keratins, eine Zuordnung über MALDI-MS war aber nicht möglich. Die abgeleitete Aminosäuresequenz erreicht nach theoretischem tryptischen Verdau gerade mit je 23% der praktischen Massen der Proteinflecken D3 und D4 eine Übereinstimmung. Ebenfalls nicht eingeteilt werden konnte die abgeleitete Aminosäuresequenz AbaK1. Sie konnte daher nicht endgültig dem „E“- noch dem „S“-Subtyp zugeordnet werden. Vergleiche mit Datenbanken („Blast“, Internet) ergaben ein gemischtes Bild.

Obwohl AbaK1 eine relativ geringe Übereinstimmung mit AbaK2 zeigt, teilen sie sich doch eine relativ hohe Anzahl an übereinstimmenden Massen der MALDI-MS-Analyse von F1 bis F5 und D1, D2 (Identitätsgruppen 1 und 4). Diese Proteinspots wurden AbaK2 zugeordnet, da hier zwischen 58 und 74% der praktischen Massen der Proteinflecken übereinstimmen (siehe Anhang F7, Tab. 12). AbaK1 kommt immerhin noch auf Werte zwischen 36 und 42%. Dies ist die höchste Anzahl an Übereinstimmungen bei einer Sequenz, die nicht einem untersuchten Proteinfleck zugeordnet wurde. Die Werte der anderen Sequenzen beziehungsweise bei anderen Proteinspots lagen im Allgemeinen bei >15%.

#### 1.4 Schwierige Zuordnung einiger Keratine

In 2D-Gelen der Cytoskelett-Präparationen von Magen und Mitteldarm waren hauptsächlich „S“-Keratine zu erwarten. Es konnten jedoch zwei Typ II Proteinflecken identifiziert werden, die sehr ähnliche Wandereigenschaften hatten wie zwei Flecken der Seitenflossenpräparation (D1 und D2, beziehungsweise F1 und F2, siehe C7, Abb. 11). Sie wurden daher von Tappe (2000) den Keratinen vom „E“-Subtyp zugeordnet. Für einen weiteren Typ I Proteinfleck im 2D-Gel des Magens wurde eine Zugehörigkeit zum „E“-Subtyp (M2 beziehungsweise F10, siehe C7, Abb. 12) vermutet. Durch die Daten der MALDI-MS-Analysen konnte gezeigt werden, daß die genannten Flecken jeweils von nur einem Keratin verursacht wurden.

Ob es sich bei dem Typ II-Keratin tatsächlich um einen Vertreter des „E“-Subtyps handelt ist schwierig zu beurteilen, da das Keratin in allen bisher präparierten Geweben vorkam. Die relative Intensität der betreffenden Proteinflecken war in der Flosse jedoch am größten. Außerdem zeigt die Sequenz sowohl in der Head- als auch in der Tail-Domäne die für „E“-Keratine typischen glycinreichen Sequenzmotive (Glycinloops). Da zusätzlich die Existenz eines Typ II<sub>E</sub>, wie auch eines Typ II<sub>S</sub>, erwartet werden kann, ist diese Einteilung sicherlich zulässig. Für das Typ I-Keratin (AbaK10; Flecken M2 und F10) ist die Zuordnung zum I<sub>E</sub>-Typ leichter. Neben einem prominenten Proteinfleck in der Flossenpräparation konnte es deutlich schwächer nur noch im Magengewebe nachgewiesen werden.

## 1.5 Ist AbaK8a dem menschlichen K8 ortholog?

Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei dem biochemisch identifizierten Typ II<sub>s</sub>-Keratin um das dem menschlichen K8 orthologe Protein. Erstaunlicherweise konnte aus der cDNA-Bank trotz zahlreicher Versuche keine entsprechende Sequenz gewonnen werden. Dies ist um so bemerkenswerter, als das K8 ebenso wie K18 bisher in allen untersuchten gnathostomen Wirbeltieren gefunden werden konnte. Während der Ontogenese von Amphibien und Säugern bildet dieses heterologe Paar die ersten Intermediärfilamente (Franz et al., 1983; Franz und Franke, 1986; Bader et al., 1988; Fouquet, 1991). Während AbaK18 mit eines der ersten in der cDNA Bank identifizierten Keratine war, konnte für das K8-Keratin vermutlich kein Klon gewonnen werden. Zwar wurde ein Klon isoliert, der ein typisches K8er-Motiv enthält, das Insert weist jedoch einige Besonderheiten auf.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz beinhaltet im Head-Bereich das für die K8-Orthologen typische Sequenzmotiv. Ein weiteres typisches Sequenzmotiv findet sich im Tail-Bereich, jedoch liegt es hier hinter dem ersten Stop-Codon, aber im gleichen Leseraster (siehe C4.2). Die Vermutung, daß es sich um einen Klon mit einem defekten Insert handelt, drängt sich auf, kann jedoch nicht endgültig bestätigt werden. Ich habe versucht, durch RT-PCR direkt aus RNA neue spezifische cDNA herzustellen, was aber mißlang. Falls eine Sequenz wie die bereits vorhandene gefunden worden wäre, hätte dies aber auch keinen endgültigen Beweis geliefert. Die *Reverse Transkriptase*, die für die RT-PCR verwendet wurde, hätte an derselben Struktur „stolpern“ können, an der auch das für die Herstellung der cDNA-Bank verwendete Enzym möglicherweise Probleme hatte.

Eine andere Überlegung ist, daß der cDNA-Klon kein defektes Insert enthält. Für diese Überlegung spricht, daß die Sequenz von AbaK8a sich im Stammbaum nicht zu den K8-Orthologen stellt (siehe Diskussion 2.3, Abb. 18). Es erfolgt eine Zuordnung zu den Keratinen des Katzenhais, wobei allerdings die Verzweigung mit einem Bootstrap-Wert von 60 nicht abgesichert ist.

Diese Einstufung wird noch durch die Daten der MALDI-MS-Analyse erhärtet. Würde es sich bei AbaK8a tatsächlich um das K8-Orthologe handeln, müßte eine Zuordnung zu dem entsprechenden (vermuteten) Proteinfleck möglich sein. Die wenigen dann theoretisch fehlenden Aminosäuren im Tail-Bereich würden bei der Menge der übereinstimmenden Massen nicht ins Gewicht fallen. Dies ist jedoch nicht der Fall. AbaK8a erreicht bei den übereinstimmenden Massen nie mehr als 23%. Da diese Überlegung allerdings voraussetzt, daß es sich bei den betreffenden Proteinflecken vom Typ II<sub>s</sub> tatsächlich um das K8-Orthologe handelt, ist sie rein theoretischer Natur.

## 1.6 Weitere Ergebnisse der MALDI-MS-Analysen

Durch MALDI-MS-Analyse konnten zusätzlich die abgeleiteten Aminosäuresequenzen (und damit indirekt auch die DNA-Sequenzen) der einzelnen Klone verifiziert werden. Das beste Beispiel dafür stellt das Protein AbaK13. Die Aminosäuresequenz endet mit einem Methionin, was relativ selten vorkommt. Dieser Sequenzabschnitt konnte jedoch bestätigt werden. Dem entsprechenden theoretischen tryptischen Peptidfragment konnte eine Masse der MALDI-MS-Analyse zugeordnet werden (siehe Anhang F6.1). Es ist theoretisch möglich, daß diese Masse zu einem anderen Fragment gehört, was durch die geringe Anzahl der Massen überhaupt und der noch kleineren Anzahl der nicht zugeordneten Massen jedoch sehr unwahrscheinlich ist.

Wie die Tabellen im Anhang F6 zeigen, verteilen sich die zugeordneten Fragmente über die gesamten Sequenzen. Auffällig ist ein Sprung von ca. 100 Aminosäuren im Head-Bereich der Keratine AbaK10, AbaK11 und AbaK14. Nach ein, zwei übereinstimmenden Massen tritt diese „Lücke“ relativ direkt am Anfang der Sequenzen auf. Danach verteilen sich die übereinstimmenden Fragmente gleichmäßig über die Sequenzen. Bedingt wird dies durch die größeren Head-Domänen in denen sich bei diesen IF-Proteinen besonders viele repetitive Sequenzabschnitte finden. Für AbaK2 und AbaK13 gilt dasselbe. Das erste übereinstimmende Fragment liegt für AbaK2 erst bei 81 Aminosäuren. Da der codierende Klon ein unvollständiges Insert enthält dürfte, ebenso wie bei AbaK13 das „erste passende“ Fragment fehlen.

Die Auswertung der MALDI-MS-Daten zeigte, daß eine hohe Anzahl an praktischen Massen keineswegs zu einer höheren Absicherung der Zuordnung führt (siehe Anhang F7, Tab. 12). Die höchsten prozentualen Übereinstimmungen wurden immer dann erreicht, wenn im Verhältnis wenige praktische Massen vorlagen. So konnten für den Proteinfleck F1 insgesamt 64 praktische Massen gewonnen werden. Dies führte zu einer Übereinstimmung mit 37 theoretischen Peptidfragmenten. Für den Fleck F2 lagen nur 43 Massen vor (also nur 2/3 von F1), es konnten dennoch 32 theoretische Fragmente zugeordnet werden. Die prozentuale Absicherung lag damit für F1 bei 58%, für F2 aber bei 74%. Ähnliche Beispiele zeigten sich bei fast allen Proteinflecken. Eine geringe Anzahl an gemessenen Massen führte nicht automatisch zu weniger Zuordnungen.

Die hier vorgestellten und diskutierten Ergebnisse verdeutlichen erneut, daß die experimentelle Kopplung verschiedenster Methoden eine überzeugende Analyse auch komplexer IF-Protein-Netzwerke ermöglicht. Immunfluoreszenzmikroskopie, SDS-PAGE mit Immunoblots und CKBB-Tests vermitteln einen Eindruck über die im Gewebe vorhandenen IF-Proteine. MALDI-MS-Analyse erlaubt die Einteilung in Identitätsgruppen, die jeweils ein echtes Keratin und seine Modifikationen repräsentieren. cDNA-Sequenzierungen geben Aufschluß über die Primärstruktur der IF-Proteine und ermöglichen eine Einordnung im molekularen Stammbaum. Nicht zuletzt können die biochemisch aufgetrennten Identitätsgruppen dann ihren Sequenzen zugeordnet werden.

## 2. Zur molekularen Evolution der IF-Proteine

Ein phylogenetischer Gesamtbaum der IF-Proteine der Eumetazoa verdeutlicht die in der Einleitung beschriebene Unterteilung der Intermediärfilamente in verschiedene Typen und gibt Aufschluß über die relative Position der Störsequenzen innerhalb der Chordaten.

Aus Internet-Datenbanken, Ergebnissen der Arbeitsgruppe und eigenen Daten konnten insgesamt 370 Aminosäuresequenzen zusammengestellt werden. Da die einzelnen Sequenzen zum Teil nur unvollständig vorlagen, wurden (wie unter B23.1 beschrieben) die Head- und Tail-Domänen bei allen Proteinen entfernt. Fehlten von der verbleibenden Rod-Domäne mehr als 9%, wurden die entsprechenden Sequenzen nicht für die Berechnung des Baumes verwendet. Wie in der Einleitung erläutert, ist die Stellung der IF-Proteine vom Typ VI umstritten und eine Zugehörigkeit zu verschiedenen Typen wird diskutiert (Steinert und Roop, 1988; Fuchs und Weber, 1994; Klymkowsky, 1995; Herrmann und Aebi, 2000). Bei der Berechnung von Testbäumen zeigte sich, daß diese Proteine sich in einem diskreten Ast gruppieren. Die Distanzwerte innerhalb wie außerhalb des Astes waren jedoch sehr groß. Proteine dieses Typs wurden daher nicht in die Berechnung des Gesamtbaums einbezogen. Der in Abb. 14 gezeigte Radial-Baum wurde mit den verbleibenden 328 Sequenzen berechnet. Zur Absicherung der einzelnen Verzweigungen wurden die zugehörigen Bootstrap-Werte, wie unter B23.1 angegeben, ermittelt. Abb. 15 zeigt die Zentralachse des Baumes noch einmal vergrößert und mit den Bootstrap-Werten der Hauptäste.

- **Die IF-Proteine ordnen sich entsprechend ihren Typen in diskreten Ästen an**

Wie in Abb. 14 gut zu erkennen ist, werden die einzelnen IF-Protein-Typen der Vertebraten in diskreten Äste gruppiert. Diese Hauptäste wurden im IF-Gesamtbaum mit blauen Klammern versehen und mit Typ I bis Typ V beschriftet.

Die IF-Proteine der Protostomier (P-IF) trennen sich zusammen mit den Laminen (Typ V) von den anderen IF-Proteinen ab (Weber et al., 1989b; Erber et al., 1998). Die Lamine stellen den einzigen IF-Proteintyp dar, der ubiquitär bei allen bisher untersuchten Tierstämmen gefunden werden konnte. Für die Vertreter der Cnidaria und der Echinodermata sind sie die einzigen IF-Proteine, von denen überhaupt Sequenzinformationen vorliegen (Holy et al., 1995; Erber et al., 1999).

Die Typ I- und II-Keratine formen je zwei distinkte Äste, die sich anscheinend schon früh in der Evolution getrennt haben. Im Gegensatz dazu formen die Typ III und IV-Proteine einen gemeinsamen Ast, vermutlich evolvierten sie aus einem gemeinsamen Vorläufer.

Die cytoplasmatischen IF-Proteine der Cephalochordaten (C) und der Tunicaten (T) bilden drei (CA, CB und CC) beziehungsweise zwei (TA und TB) separate Äste außerhalb der IF-Proteintypen der Vertebraten. Sie können alleine an Hand ihrer Sequenzinformationen nicht den verschiedenen IF-

Typen der Vertebraten zugeordnet werden. Erst Daten aus biochemischen Untersuchungen erlauben für einige IF-Proteine, sowohl der Cephalochordaten als auch der Tunicaten, eine Zuordnung zu den verschiedenen IF-Typen der Vertebraten (Karabinos et al., 1998; Riemer und Weber, 1998; Karabinos et al., 2000; Wang et al., 2000). Diese Sequenzen eignen sich deshalb nur sehr bedingt als Aussen-Gruppe bei der Berechnung von molekularen Stammbäumen für IF-Proteine des Störs. Die Stellung der beiden Tunicaten-Äste (T) auf der Seite der Typ III/IV-IF-Proteine zeigt, daß die Tunicaten noch keine IF-Proteine aufweisen, die den Keratinen nahe stehen.

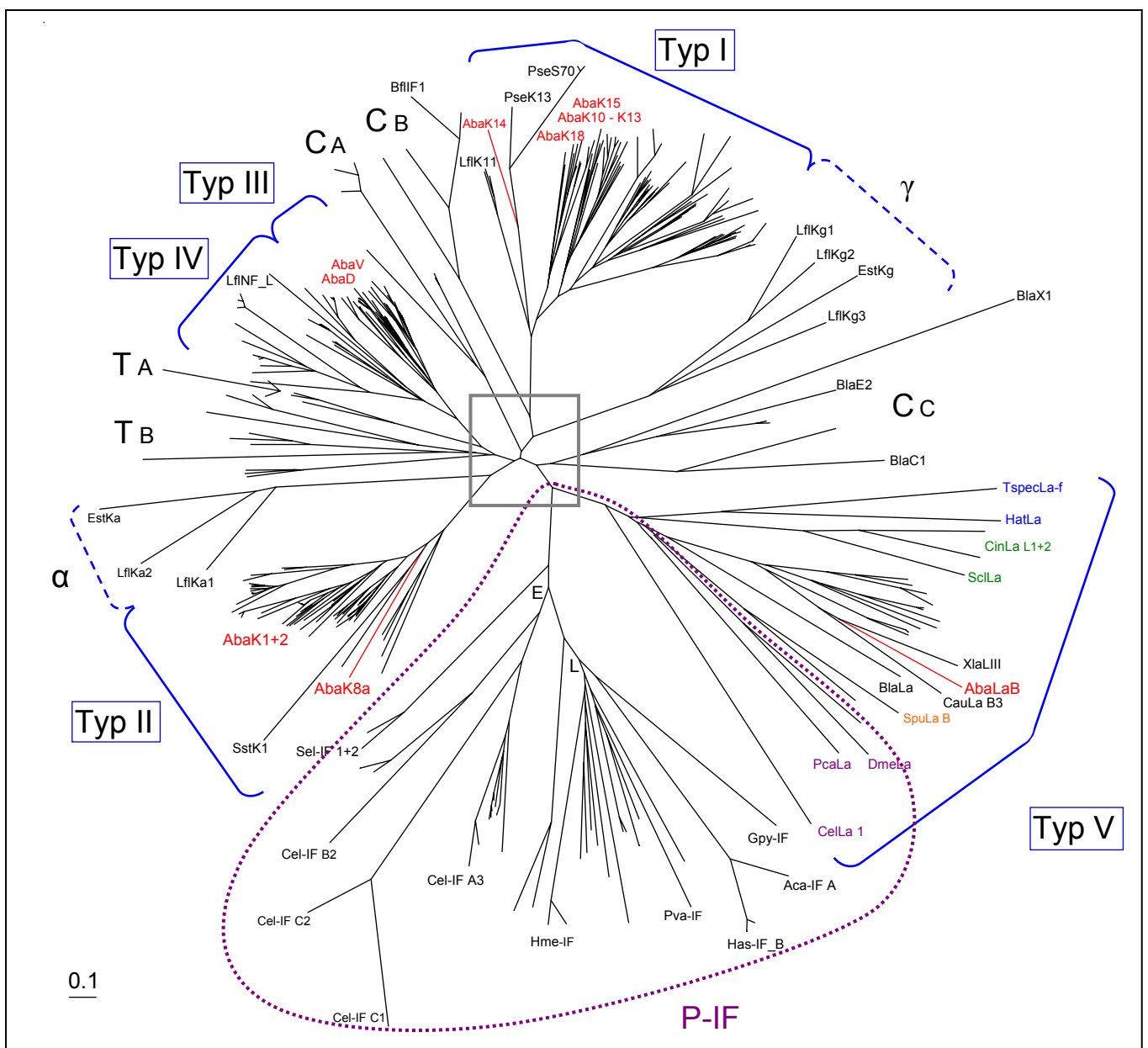


Abb. 14 Legende: siehe nächste Seite

**Abb. 14** (vorhergehende Seite) Phylogenetischer Radialbaum von 328 IF-Proteinsequenzen aller bisher untersuchten Tierstämme nach einem multiplen Sequenzalignment der Rod-Domäne. Die Distanz unten links beschreibt 0,1 Aminosäuresubstitutionen pro Position (nach JTT). Die einzelnen Äste der IF-Proteintypen sind mit **blauen** Klammern näherungsweise gekennzeichnet. Die IF-Proteine der Protostomier sind mit **violetten Punkten** umrandet. Die ungefähren Positionen der in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzen sind mit **roter** Schrift hervorgehoben. Mit **blauer** Schrift wurden die Lamine der Cnidaria (**Hat**, *Hydra attenuata*; **Tspec**, *Tyela spec*) markiert. Die der Echinodermaten (**Spu**, *Strongylocentrotus purpuratus*) mit **orange** und die der Tunicaten-Lamine (**Cin**, *Ciona intestinalis*; **Scl**, *Styela clava*) mit **grüner** Schrift. Die cytoplasmatischen IF-Proteine der Cephalochordaten *Branchiostoma lanceolatum* (**Bla**) und *B. floridae* (**Bfl**) verteilen sich auf drei Äste: **CA** (BflA1, -A2, -A3, -B1; Bla-B1, -B2), **CB** (BlaE1, -Y1, -K1; Bfl-IF1) und **CC** (BlaC1, -C2, -D1, -E2, -X1; BflC1, -D1). Die cytoplasmatischen IF-Proteine der Tunicaten (**T**) *Ciona intestinalis* (**Cin**), *Molgula oculata* (**Moc**), *Styela clava* (**Scl**) und *Styela plicata* (**Spl**) verteilen sich auf zwei Äste: **TA** (CinA2; SclA1; SplA1) und **TB** (CinB2, -C2, -D2, -F2; MocC1, -D1; SclB1, -C1, -D1; SplB1). Das grau umrandete Zentrum des Baums wird in Abb. 15 vergrößert dargestellt. Zur groben Orientierung sind einige Proteine an ihren Positionen angegeben (**Aba**, *Acipenser baeri*, Stör; **Aca**, *Aplysia californica*; **Cau**, *Carassius auratus*, Goldfisch; **Cel**, *Caenorhabditis elegans*; **Dme**, *Drosophila melanogaster*, Fruchtfliege; **Est**, *Eptatretus stouti*, Schleimaal; **Gpy**, *Glottidia pyramidata*; **Has**, *Helix aspersa*, Schnecke; **Hme**, *Hirudo medicinalis*, Blutegel; **Lfl**, *Lampetra fluviatilis*, Neunauge; **Pca**, *Priapulus caudatus*; **Pse**, *Polypterus senegalus*, Flösselhecht; **Pva**, *Phoronis vancouverensis*; **Sel**, *Sagitta elegans*; **Sst**, *Scyliorhinus stellaris*, Katzenhai; **Xla**, *Xenopus laevis*, Krallenfrosch). Die zugehörigen Accession-Nummern finden sich im Anhang F2.

- **Die IF-Proteine des Störs ordnen sich zu den verschiedenen IF-Typen der anderen Vertebraten**

Von den aus der cDNA-Bank von *Acipenser* gewonnenen Proteinen wurden die Intermediärfilamente an Hand von Datenbankvergleichen identifiziert und so auch den jeweiligen IF-Typen zugeordnet. Die vorgenommenen Einteilungen werden durch die Positionen der Sequenzen im IF-Gesamtbaum bestätigt. Die einzelnen IF-Proteine des Störs ordnen sich entsprechend ihren vorher bestimmten Typen in den jeweiligen Hauptästen der Vertebraten an. Die Positionen wurden mit roter Schrift und Umrandung hervorgehoben, ebenso wurden die zugehörigen Äste rot markiert (Abb. 14).

Allerdings war es durch die hohe Anzahl und Dichte der verschiedenen IF-Proteine in den Hauptästen für einige Proteine nicht möglich, ihnen einzelne Äste exakt zuzuordnen. Dies gilt vor allem für die Typ I und Typ II-IF-Proteine, da hier die Anzahl der bekannten Sequenzen besonders hoch ist. In diesen Fällen wurden die Bezeichnungen der Proteine nur der Gruppe von Ästen beige gestellt, zu denen sie gehören.

In jedem Fall nahmen die Störsequenzen dabei eine relativ basale Stellung in den jeweiligen Ästen ein, standen jedoch über den Sequenzen vom Neunauge *Lampetra*. Daher eignen sich die entsprechenden IF-Proteine von *Lampetra* hervorragend als Außengruppe zur Berechnung von molekularen Stammbäumen für IF-Proteinen des Störs (siehe spätere Abschnitte).

- **Trennen sich die IF-Proteine der Protostomier in Ecdysozoa und Lophotrochozoa?**

Die IF-Proteine der Protostomier ordnen sich, abgesehen von zwei IF-Proteinen des Chaetognathen *Sagitta elegans* (Sel-IF), unabhängig von ihrer Funktion als neuronale beziehungsweise nicht-neuronale IF-Proteine in zwei diskrete Äste an. In dem in Abb. 14 mit „E“ bezeichneten Ast finden sich die Sequenzen von sieben Vertretern der Nematoden. In dem mit einem „L“ versehenen Ast gruppieren sich sechs Vertreter der Mollusken, vier Anneliden, je zwei Brachiopoden und Nemertini sowie je ein Vertreter von Sipuncula, Plathelminthen und Echiuriden. Ob diese Aufteilung aus den Besonderheiten der Nematoden folgt oder eine Bestätigung der neu diskutierten Unterteilung der Protostomier in Lophotrochozoa (L) und Ecdysozoa (E) wiedergibt (Adoutte et al., 2000), bleibt zur Zeit noch offen. Die Verzweigung an sich ist mit einem Bootstrap-Wert von 82 jedenfalls relativ gut abgesichert. Interessant ist die basale Stellung von *Sagitta elegans* (Sel) im Protostomier-Ast. Die Chaetognathen wurden früher zu den Deuterotomiern gezählt, was aber seit geraumer Zeit bezweifelt wird (Telford und Holland, 1993). Ob sie allerdings tatsächlich zu den Protostomiern gehören ist auch weiterhin unklar (Mallatt und Winchell, 2002).

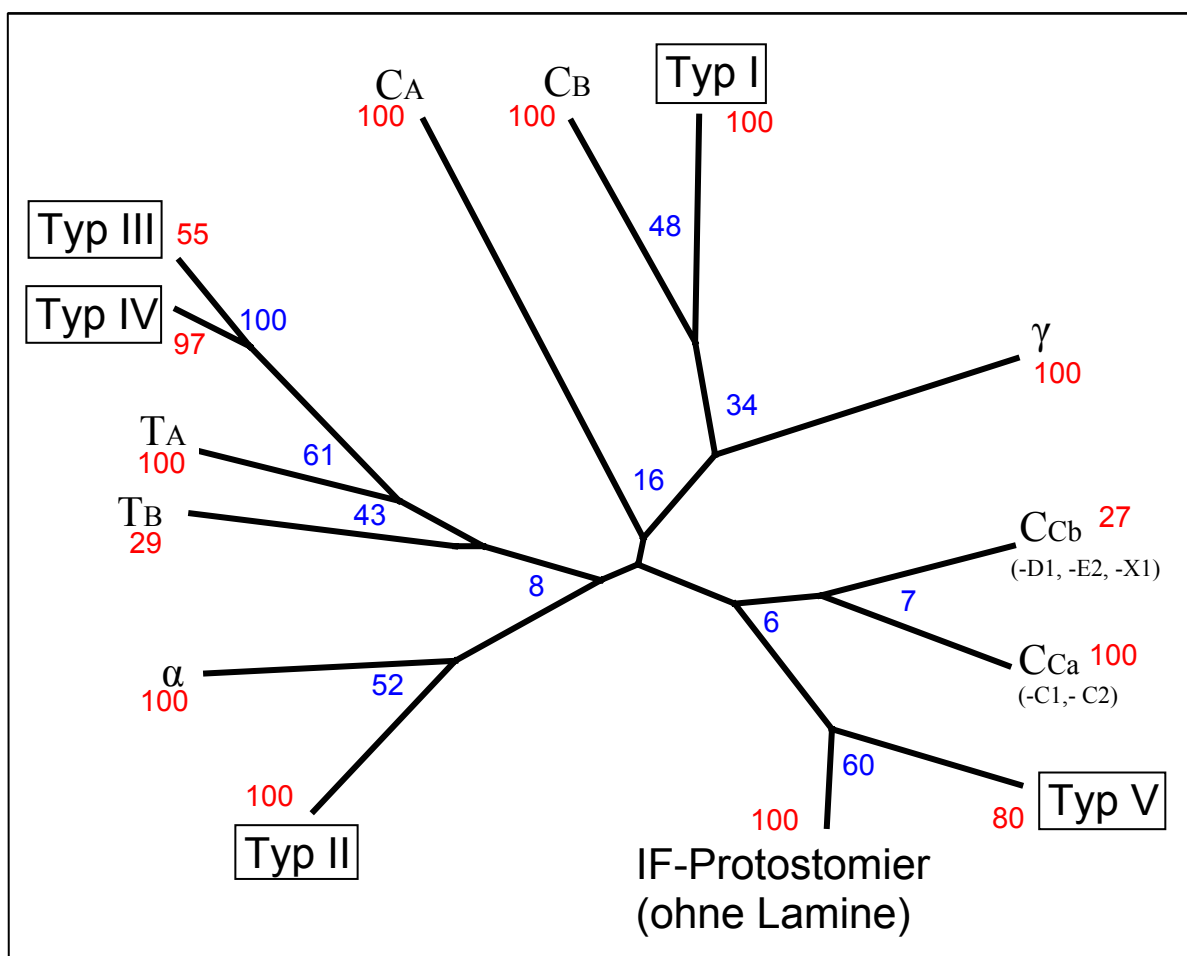
- **Die Position der einzelnen Hauptäste ist noch unsicher**

Wie bereits erwähnt, teilt sich der Gesamtbaum aus Abb. 14 in distinkte Hauptäste auf. Zur Verdeutlichung der Verzweigungspunkte wurde das Zentrum in Abb. 15 vergrößert dargestellt. Außerdem wurden die Bootstrap-Werte der einzelnen Äste (rote Zahlen) sowie der ersten Verzweigungen (blaue Zahlen) eingetragen. Dabei zeigt sich, daß die einzelnen Hauptäste mit Werten von zumeist 100 sehr gut abgesichert sind. Ganz im Gegensatz dazu stehen die Verzweigungen der Äste, sie weisen fast durchgehend sehr niedrige Werte auf. Da Bootstrap-Werte unter 75 praktisch keine Absicherung mehr bedeuten (Felsenstein, 1985), sind diese Verzweigungen nicht abgesichert. Die entsprechenden Zahlen wurden in Abb. 15 nur der Vollständigkeit halber angegeben. Das heißt, daß der „Inhalt“ der einzelnen Haupt-Äste zwar sehr gut abgesichert ist, die endgültige Position im radialen Baum aber offen bleibt. Die Absicherung einzelner Äste kann durch die Anwesenheit ungeeigneter Sequenzen stark verschlechtert werden. So zeigte der C-Ast der Cephalochordaten (C) im Gesamtbaum eine nur sehr schwache Absicherung. Betrachtet man jedoch die Werte der enthaltenen „Unter-“Äste, so ändern sich die Verhältnisse. Zur Verdeutlichung wurde in Abb. 15 der Hauptast CC in zwei separate Einheiten Ca und Cb zerlegt. Für Ca stieg so der Bootstrap-Wert so auf 100, während er für Cb sehr niedrig blieb. Die im Ast Cb enthaltene Sequenz BlaX1 stört die Absicherung des Zweiges. Dies spiegelt die große Distanz des Proteins zu den IF-Proteinen der „eigenen“ Taxa wider, was sich auch in dem sehr langen Ast von BlaX1 im Gesamtbaum (Abb. 14) zeigt. Solche abgeleiteten Sequenzen wurden bei der Berechnung von Einzelbäumen nicht verwendet.

Zum Vergleich, in wie weit die IF-Proteine der Cephalochordaten und Tunicaten die Bootstrap-Werte des Gesamtbaumes beeinflussen, wurde ein weiterer Baum ohne diese Sequenzen berechnet (nicht

abgebildet). Die Absicherung der einzelnen Hauptäste (Typ I, II, II+IV und V) betrug bei diesem Baum 100 beziehungsweise für die Protostomier-IF (P-IF) 99%. Damit wurde für die Typ III-IF-Proteine eine deutliche Verbesserung erreicht. Die Mittelachse des Baumes, das heißt die Trennung zwischen Typ I und II gegen Typ III, IV, V und P-IF war mit 44% abgesichert, was aber nur eine zahlenmäßige Verbesserung bedeutet. Die Mittelachse ist weiterhin statistisch nicht abgesichert.

Obgleich einige morphologische wie molekulare Daten darauf hinweisen, daß die Urchordaten (Tunicaten) phylogenetisch ursprünglicher als die Cephalochordaten sind, ist diese Frage bisher noch nicht endgültig geklärt. Der Gesamtbaum kann zur Klärung dieser Frage nicht beitragen (Garstang, 1928; Wada und Satoh, 1994; Wada, 1998; Cameron et al., 2000; Riemer et al., 2000; Shu et al., 2001).



**Abb. 15** Zentraler Bereich des radialen Gesamtbaums aus Abb. 14. Die Äste der etablierten (Vertebraten-) IF-Proteine wurden mit den entsprechenden Typen gekennzeichnet. Die Äste der Cephalochordaten (C) und der Tunicaten (T) wurden wie in Abb. 14 beschriftet. Der CC-Ast der Cephalochordaten wurde anders als in Abb. 14 in zwei Unteräste (CCa und CCb) getrennt (siehe Text). Rote Zahlen geben die Bootstrap-Werte der Hauptäste wieder. Blaue Zahlen geben den Bootstrap-Wert der ersten Verzweigung im Hauptast an. Die Werte wurden mit 100 Pseudosamples berechnet und geben die Häufigkeit wieder, mit der die entsprechende Verzweigung aufgetreten ist. Wie die Bootstrap-Werte zeigen, sind die meisten Hauptäste statistisch abgesichert, während sämtliche Verzweigungen im Zentralbereich völlig willkürlich sind. Die Länge der Äste wurde am Rand des Ausschnitts begrenzt.

## 2.1 Die Lamine und die Evolution der IF-Proteine der Metazoen

Das von mir identifizierte Lamin des Störs (AbaLaB) weist alle Merkmale eines typischen Lamins der Vertebraten auf:

Eine Insertion von 42 Aminosäuren im 1B-Coil, ein lamin-homologes Motiv in der Tail-Domäne, aminoterminal davon ein Kernlokalisierungsmotiv und carboxyterminal davon ein Cluster von sauren Aminosäuren sowie eine terminale CaaX-Box.

Es ordnet sich im phylogenetischen Baum mit den anderen bisher als Typ B<sub>3</sub> eingestuften Laminen in einen separaten Ast (Abb. 16). Anscheinend handelt es sich bei AbaLaB um ein Lamin vom B<sub>3</sub>-Subtyp. Zusammen mit dem identifizierten Lamin des Störs sind nun vier vollständige Typ B<sub>3</sub>-Lamine von je einem Amphibium (Stick, 1988), einem Knorpelganoiden und zwei Teleosteen bekannt (Yamaguchi et al., 2001; Hofemeister et al., 2002).

Der B<sub>3</sub>-Subtyp tritt hauptsächlich in Oocyten auf, bei *Xenopus* konnte er jedoch auch in spezialisierten adulten Geweben gefunden werden (Benavente et al., 1985). Für die Herstellung der cDNA-Bank von *Acipenser* wurden keine Ovarien oder in der Nähe liegende Gewebe verwendet. Falls nicht zufällig Gewebeteile in die Präparation geraten sind, sollte das gefundene Lamin daher aus ähnlichen spezialisierten Zellen stammen. Eventuell wurde auch durch das sehr junge Alter des Tieres die Expression dieses Proteins noch nicht herunterreguliert.

Vom *Xenopus*-Lamin LIII existieren mindestens zwei Splice-Varianten (Döring und Stick, 1990). Das Besondere an der Variante LIII<sub>b</sub> ist das Fehlen eines Methionins in der terminalen CaaX-Box. Diese Eigenschaft findet sich auch beim Lamin des Störs. Ob mit AbaLaB<sub>3</sub> ebenfalls eine Splice-Variante vorliegt, kann mit den vorhandenen Daten nicht gesagt werden. Da der Stör tetraploid ist (Ludwig et al., 2001), besteht hier eine gute Möglichkeit noch weitere Varianten zu finden.

Bei der Identifizierung des Lamins LIII von *Xenopus* war noch nicht klar, ob es sich um die funktionelle Adaptation eines einzelnen Lamins oder um einen eigenen Subtyp handelt. Das nun mehrere Typ B<sub>3</sub>-Lamine von verschiedenen gnathostomen Vertebraten vorliegen zeigt, daß es sich um einen eigenen Typ von Lamin handelt. Dies zeigen auch die berechneten Identitäten der Typ B<sub>3</sub>-Lamine (Tab. 7). Diese weisen untereinander eine größere Identität auf als zu den übrigen Typ B-Laminen. Es handelt sich bei diesen Laminen offensichtlich um einen eigenen Lamintyp und nicht um in der Evolution mehrfach konvergent entstandene Proteine.

Die Typ A-Lamine gingen durch Genduplikation und Insertion eines Exons vermutlich aus einem Typ B<sub>3</sub>-Lamin hervor, nachdem diese sich von den Typ B<sub>1/2</sub>-Laminen getrennt hatten (Stick, 1992; Stick, 1994). Im Stammbaum ordnen sich die Typ A- und B<sub>3</sub>-Lamine mit guter Absicherung als Schwestergruppen an (Abb. 16). Dies bestätigt die nahe Verwandtschaft der beiden Typen, sagt aber nichts darüber, welcher Typus ursprünglicher ist. Ähnliches zeigen die Sequenzidentitäten (Tab. 7).

AbaLaB<sub>3</sub> weist zu den Typ A-Laminen eine ähnlich hohe Sequenzidentität wie zu den übrigen B<sub>3</sub>-Laminen auf. Insbesondere durch die Standardabweichung von 2,0-2,8% wird der Unterschied marginal. Dies bestätigt ebenfalls die nahe Verwandtschaft der beiden Lamintypen.

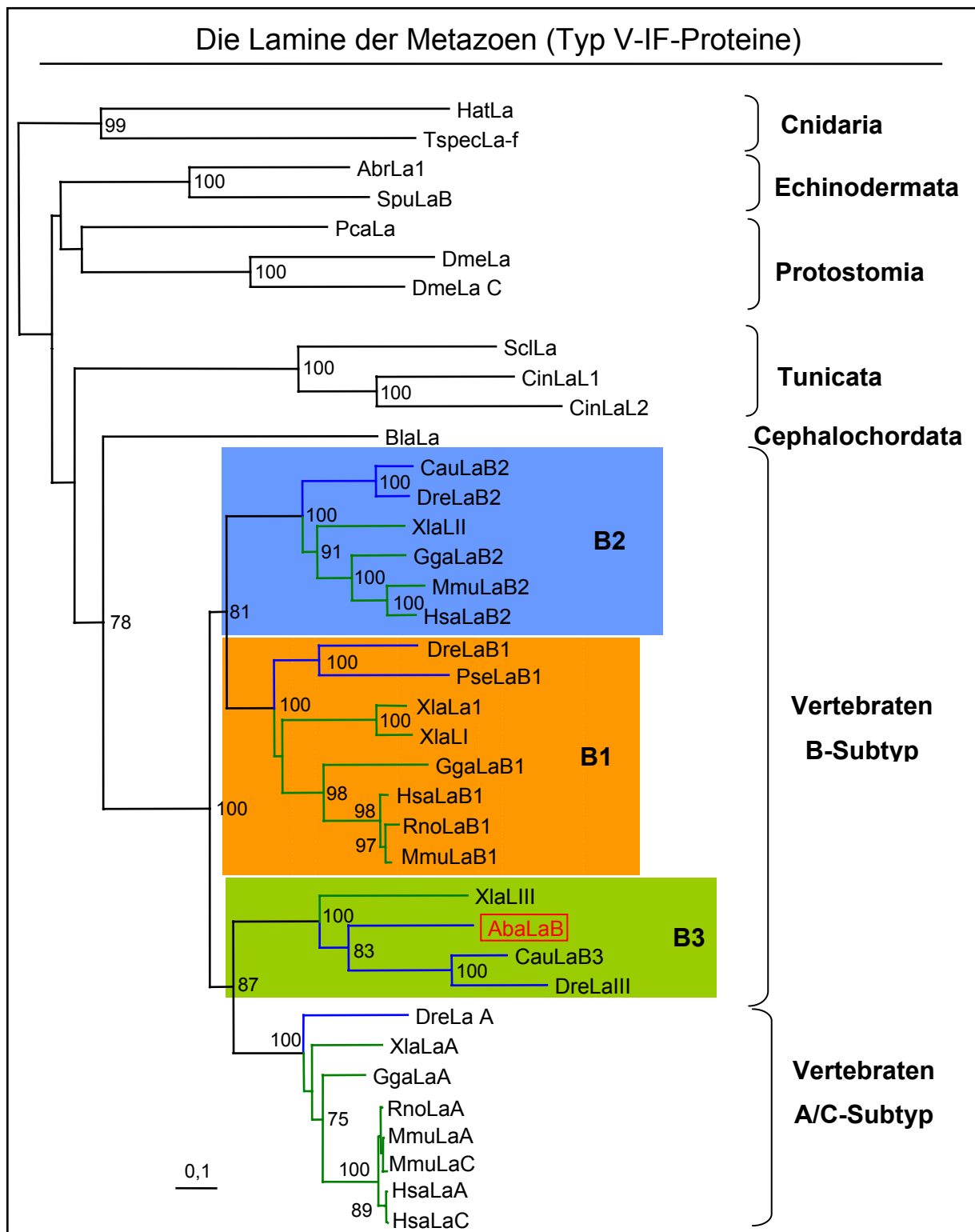
Die Lamine vom B<sub>3</sub>-Subtyp weisen stärker modifizierte Head- und Tail-Domänen als die übrigen Lamine auf. Die Identität der gesamten Sequenz (Tab. 7) des als Lamin eingestuften IF-Proteins von *Hydra* (HatLaA) (Erber et al., 1999), einem Vertreter der Cnidaria, zu den B<sub>3</sub>-Laminen beträgt knapp unter 30%. Die übrigen Lamine weisen eine Identität von rund 35% auf. Daß die geringere Identität der B<sub>3</sub>-Lamine durch die Head- und Tail-Domänen verursacht wird, zeigt ein Vergleich mit den Werten der Rod-Domänen. Der Unterschied zwischen den verschiedenen Lamintypen wird deutlich kleiner. Die stärker modifizierten Domänen könnten eine Anpassung der B<sub>3</sub>-Lamine an die besonderen Anforderungen in den Oocyten sein (Stick, 1988; Benavente et al., 1985; Yamaguchi et al., 2001; Hofemeister et al., 2002).

### 2.1.1 Ein phylogenetischer Baum der Metazoen-Lamine

Mit 37 Laminen der Metazoen wurde ein phylogenetischer Baum berechnet (Abb. 16). Als Außengruppe dienten die als Lamine eingestuften Proteine zweier Cnidaria (Erber et al., 1999). Sie sind die einzigen bisher sequenzierten IF-Proteine außerhalb der Bilateria. Interessanterweise ordnen sich die Äste der Invertebraten genau entsprechend den Tierstämmen an.

Obwohl nur wenige Invertebratensequenzen zur Verfügung stehen, wurde das Lamin La1 von *Caenorhabditis elegans* nicht für die Berechnung des Stammbaumes verwendet. Für *C. elegans* ist gezeigt worden, daß dieser Organismus einem starken genetischen Drift unterlag (Aguinaldo et al., 1997). So ist auch CellLa1 stark abgeleitet (Riemer et al., 1993) und zeigt im Gesamtbaum (siehe Abb. 14) einen sehr langen Ast. In einem zur Kontrolle berechneten Stammbaum (nicht abgebildet) ordnete sich das Lamin in den Ast der Tunicaten.

Die Aufteilung der einzelnen Lamin B-Subtypen in diskrete Äste wurde durch verschiedenfarbige Hintergründe hervorgehoben. Die Lamine vom Typ B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> ordnen sich zusammen in einen eigenen Ast, was ihre Herkunft aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen verdeutlicht. Mit einem Bootstrap-Wert von 100 ist diese Verzweigung sehr gut abgesichert. Auf Grund der Genstruktur der B<sub>3</sub>-Lamine werden diese eher dem B- als dem A/C-Typ zugerechnet (Döring und Stick, 1990), gelten aber als eigener Typ. Die mit einem Bootstrap-Wert von 87 ebenfalls gut abgesicherte Verteilung auf zwei getrennte Äste bestätigt diese Annahme.



**Abb. 16** Molekularer Stammbaum mit 37 Typ V-IF-Proteinen (Lamine) der Metazoen nach einem multiplen Alignment der Rod-Domänen. Als Außengruppe dienen die Sequenzen zweier Cnidaria. Die Distanzmarkierung unten links beschreibt 0,1 Aminosäuresubstitutionen pro Position (nach JTT). Die Zahlen an den Verzweigungen geben die Bootstrap-Werte an. Werte unter 75% wurden nicht angegeben. Mit **blauen** Ästen wurden die Sequenzen der Knochenfische hervorgehoben, mit **grünen** die der Landwirbeltiere (Tetrapoda). Die Sequenz vom Stör wurde mit **rot** markiert und umrandet. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: **Aba**, *Acipenser baeri*, Stör; **Abr**, *Astropecten brasiliensis*; **Bla**, *Branchistoma lanceolatum*, Lanzettfischchen; **Cau**, *Carassius auratus*, Goldfisch; **Cel**, *Caenorhabditis elegans*; **Cin**, *Ciona intestinalis*; **Dme**, *Drosophila melanogaster*, Fruchtfliege; **Dre**, *Danio rerio*, Zebraquarienfisch; **Gga**, *Gallus gallus*, Huhn; **Hsa**, *Homo sapiens*, Mensch; **Mmu**, *Mus musculus*, Maus; **Pca**, *Priapulid caudatus*; **Pse**, *Polypterus senegalus*, Flösselhecht; **Rno**, *Rattus norvegicus*, Ratte; **Scl**, *Styela clava*; **Tspec**, *Telia spec*; **Xla**, *Xenopus laevis*, Krallenfrosch. Die Accession-Nummern der Sequenzen finden sich im Anhang unter F2.

### 2.1.2 Die Lamin-Sequenz der Tunicaten zeigt nur geringe Identität zu jenen der Vertebraten

Vergleicht man die Identitäten der Lamine (Tab. 7) der Vertreter der Echinodermaten (*Astropecten brasiliensis*; Abr) und Protostomier (*Priapulius caudatus*, Pca) mit denen der Lamine vom Typ B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> der Vertebraten, fällt auf, daß die Werte für die gesamte Sequenz um etwa 6-12% und für die Rod um 3-9% größer sind als die des Vertreters der Tunicaten (*Styela clava*, Scl). Diese größeren Identitäten lassen die Protostomier und Echinodermaten näher mit den Vertebraten verwandt erscheinen als die Tunicaten, was auf Grund aller anderen stammesgeschichtlichen Daten natürlich nicht sein kann.

**Tab. 7** Identitätsmatrix der Typ V-IF-Proteine (Lamine). Die Identitäten wurden mit dem Programm „Mega“ nach dem Modell „p-distance“ berechnet und sind in Prozent Identität angegeben (zur Methode siehe B23.1). Die als B<sub>3</sub>-Lamin identifizierte Sequenz des Störs (AbaLaB<sub>3</sub>) wurde zum einen mit verschiedenen Lamintypen vom Goldfisch (Cau), Zebraärb ling (Dre), Krallenfrosch (Xla) und Mensch (Hsa) verglichen. Zum anderen fand ein Vergleich mit als Laminen identifizierten Sequenzen von Cnidaria (*Hydra*, Hat), Echinodermata (*Astropecten*, Abr), Protostomia (*Priapulius*, Pca), Tunicata (*Styela*, Scl) und Cephalochordata (*Branchiostoma*, Bla) statt. Die untere linke Hälfte wurde mit den gesamten Sequenzen, die obere rechte Hälfte nur mit der konservierten helikalen Rod-Domäne berechnet. Die Werte für die Standardabweichungen liegen zwischen 2,0 und 2,8%. Felder der Matrix, die das Lamin des Störs betreffen, sind grau unterlegt. Die Accession-Nummern der verwendeten Sequenzen finden sich im Anhang F2.

Rod \ Gesamt	HatLa	AbrLa1	PcaLa	SclLa	BlaLa	AbaLaB3	CauLaB3	DreLaII	XlaLIII	DreLaB1	XlaLI	HsaLaB1	DreLaB2	XlaLII	HsaLaB2	DreLaA	XlaLaA	HsaLaA
HatLa	--	32,9	34,2	32,3	32,6	28,0	28,9	30,8	28,0	32,6	32,6	31,7	31,7	32,9	32,9	32,6	30,2	32,9
AbrLa1	35,9	--	43,1	31,7	41,2	36,6	33,8	34,8	38,5	37,8	38,5	39,4	39,1	39,4	40,3	39,1	40,3	40,6
PcaLa	37,1	43,7	--	32,3	44,9	34,5	36,6	34,8	37,5	42,8	40,3	43,1	40,9	40,3	42,2	40,6	41,8	39,7
SclLa	29,0	29,5	31,2	--	35,1	31,7	33,2	32,6	34,2	32,9	33,5	34,2	34,8	33,2	33,8	35,1	35,4	36,9
BlaLa	34,4	42,2	44,9	33,4	--	38,5	40,0	35,7	40,0	40,9	43,7	45,8	41,2	41,5	44,0	42,8	45,8	46,5
AbaLaB3	29,8	38,3	34,9	30,0	40,0	--	64,0	61,8	65,2	50,8	52,0	52,9	50,5	48,6	49,5	55,7	58,5	57,2
CauLaB3	29,3	34,9	34,9	30,0	39,8	60,2	--	79,1	59,1	48,9	51,4	51,4	49,8	48,0	51,4	51,4	54,5	54,2
DreLIII	29,8	35,1	33,9	29,0	35,6	58,3	76,1	--	53,8	46,5	48,6	46,5	45,5	44,9	47,4	49,2	50,8	51,1
XlaLIII	29,3	40,0	36,8	30,5	39,5	65,1	54,6	49,8	--	52,3	51,4	52,3	48,0	48,0	48,9	54,2	57,8	57,8
DreLaB1	34,4	40,2	42,7	31,2	43,2	51,0	46,6	43,9	51,2	--	65,2	69,5	60,3	57,8	57,8	56,6	57,8	57,2
XlaLI	34,9	41,5	41,2	31,2	46,1	52,4	49,0	47,3	51,0	67,1	--	72,3	55,7	56,0	57,5	53,5	58,5	58,2
HsaLaB1	33,9	41,5	43,2	32,2	47,3	52,0	49,3	44,6	51,5	70,5	74,1	--	61,5	58,5	60,6	56,9	62,2	59,1
DreLaB2	34,6	42,0	42,4	32,9	45,1	51,2	47,8	43,7	48,0	61,0	57,8	61,5	--	74,2	70,8	59,1	57,2	59,7
XlaLII	35,9	42,0	41,2	31,0	44,9	49,3	46,8	42,9	48,0	58,8	58,8	59,3	75,1	--	75,1	57,8	57,2	59,1
HsaLaB2	36,1	42,9	43,2	32,2	45,9	50,2	49,0	44,6	48,3	58,0	59,3	60,5	72,2	76,1	--	55,7	56,6	57,8
DreLaA	34,1	41,5	41,5	31,7	44,4	55,1	48,8	46,6	52,9	55,4	52,9	54,9	59,3	57,1	56,1	--	76,0	76,9
XlaLaA	32,2	42,2	42,7	32,9	46,8	58,3	51,2	48,0	56,8	57,1	58,0	60,0	58,5	59,3	58,5	74,1	--	82,2
HsaLaA	34,4	41,2	40,5	33,7	46,6	56,3	51,7	48,8	56,1	55,1	55,9	56,8	59,0	57,8	58,0	74,9	80,5	--

Von der Stellung der Proteine im Baum her wäre daher auch ein umgedrehtes Zahlenverhältnis zu erwarten gewesen. Hier ordnen sich die Tunicaten eindeutig näher zu den Vertebraten als die Protostomier und die Echinodermaten, wobei allerdings die Verzweigungen praktisch nicht abgesichert sind.

Der Sequenz von ScLla fehlt die lamintypische konservierte Insertion von 105 Aminosäuren in der Tail-Domäne (Döring und Stick, 1990; Riemer et al., 1998; Riemer und Weber, 1998). Diese hat einen großen Einfluß auf die Sequenzidentität für die gesamte Sequenz. Bei Laminen mit dieser Insertion liegt die Sequenzidentität zu anderen Laminen für die Rod-Domäne niedriger als für die gesamte Sequenz. Bei den übrigen IF-Proteinen verhält es sich genau umgekehrt.

Das Fehlen dieser Insertion erklärt aber nicht die ebenfalls geringere Identität der Rod-Domäne von ScLla zu den Vertebraten-Laminen. Möglicherweise handelt es sich dabei aber um eine Besonderheit der verwendeten Sequenz von *Styela aplicata* und nicht um eine generelle Einordnung der Taxa.

Weitere Vergleiche sind schwierig, da insgesamt nur wenige Sequenzen vorliegen und sich diese kaum für einen besseren Vergleich eignen.

Für die Tunicaten liegen nur zwei weitere Laminsequenzen von *Ciona intestinalis* (Cin) vor, bei denen ebenfalls die Insertion von 105 Aminosäuren in der Tail-Domäne fast vollständig fehlt (Riemer et al., 2000). Diese Deletion stellt möglicherweise ein spezifisches Merkmal der Tunicaten-Lamine dar. Eine Berechnung der Identitäten (nicht in der Tabelle abgebildet) zeigte, daß die beiden Lamine von *Ciona* sehr ähnliche Werte wie ScLla aufweisen. Dieses Ergebnis war zu erwarten gewesen, da die Sequenzen im Stammbaum (Abb. 16) auch ähnliche Distanzen aufweisen.

Bei den Protostomier liegen weitere Lamin-Sequenzen bisher nur von *D. melanogaster* und *C. elegans* vor. Von beiden Organismen ist aber durch Untersuchungen der 18S ribosomalen rRNA bekannt, daß sie einem starken Gendrift unterlagen (Aguinaldo et al., 1997). Deren Daten dürften daher kaum zur Klärung der obigen Frage geeignet sein. Um klären zu können, ob es sich um eine Besonderheit der verwendeten Sequenzen handelt, sind daher weitere Daten von anderen Organismen notwendig.

## 2.2 Die Typ I-Keratine

Obwohl den K18-Orthologen aller bisher untersuchten gnathostomen Wirbeltiere ein vereinendes Sequenzmotiv fehlt, bilden sie innerhalb eines molekularen Stammbaums einen diskreten Ast gegenüber den übrigen Typ I-Keratinen der gnathostomen Vertebraten (Abb. 17) (Schaffeld et al., 1998). Sowohl in der Head- als auch in der Tail-Domäne kann zwar ein kleines wiederkehrendes Motiv identifiziert werden, dieses tritt jedoch auch bei anderen Typ I-Keratinen auf und ist daher nicht spezifisch für die K18-Orthologen. Gemeinsam hingegen ist allen bisher untersuchten K18, daß sie obligat in einfachen Epithelien und in Koexpression mit K8 vorkommen. Während der Ontogenese von Säugern und Amphibien bildet das heterologe Paar der „S“-Keratine K8 und K18 die ersten Intermediärfilamente (Franz und Franke, 1986; Bader et al., 1988; Fouquet, 1991).

### 2.2.1 Stellen die K18-Orthologen die ursprünglichsten Typ I-Keratine dar?

Während frühere Daten annehmen ließen, daß die K18-Orthologen die ursprünglichsten Typ I-Keratine darstellen, werfen aktuelle Daten vom Stör (Aba) und vom Flösselhecht (Pse) (Schätzlein, 2001) (Höffling, 2001) neue Fragen auf. Im molekularen Stammbaum ordnet sich AbaK14 zusammen mit drei weiteren Keratinen vom Flösselhecht basal zu allen sonst bisher bekannten Typ I-Keratinen der gnathostomen Vertebraten an (Abb. 17). Die basale Stellung impliziert die Annahme, daß diese Art Keratine bereits vor dem oben beschriebenen Aufspaltungsereignis in K18-Orthologe und restliche Typ I-Keratine auftraten. Ob das tatsächlich der Fall war, kann mit den zur Zeit vorhandenen Daten nicht abschließend beantwortet werden.

Gegen diese Annahme spricht, daß entsprechende Keratine in anderen Wirbeltierklassen bisher nicht gefunden werden konnten. Außerdem können diese Art IF-Proteine erst nach der Aufspaltung aufgetreten sein, entwickelten sich dann aber bedeutend schneller als die übrigen Keratine. Solch eine starke Ableitung bedingt bei der Berechnung des Stammbaumes eine sogenannte „long branch attraction“. Dieser Fehler, bei dem Einheiten mit langen Distanzästen zusammen und basal gruppiert werden, tritt bei allen bisher verwendeten Algorithmen auf (Felsenstein, 1978; Hillis et al., 1994). Ein ähnliches Problem besteht bei den keratinartigen (Schleim-) Proteinen des Agnathen *Lampetra* (Schultess, 2001). Diese werden im Gesamtbaum (siehe Abb. 14) basal zu den entsprechenden Typ I- und II-Keratinen, auch des Neunauges, gestellt.

Es gibt jedoch einige Argumente, die dafür sprechen, daß die K18-Orthologen nicht die ursprünglichsten Typ I-Keratine darstellen. So wurde beim Neunauge *Lampetra* (Lfl) eine Sequenz identifiziert, die auf Grund ihrer biochemischen Eigenschaften als K18-Ortholog eingestuft wurde (Schultess, 2001). Sie ordnet sich aber nicht in den beschriebenen K18-Ast, sondern gruppiert sich mit den übrigen Typ I-Keratinen von *Lampetra*.

Anscheinend kam es in einem frühen Vertreter der gnathostomen Vertebraten zu einer Duplikation eines IF-Gens. Aus diesem entstand dann der Vorläufer des K18-Gens sowie ein zweites Typ I-Gen. Aus Letzterem wiederum entstanden dann die unterschiedlichen Typ I-Varianten, inklusive der Typ I<sub>E</sub>-Keratine (Schaffeld et al., 1998; Schaffeld et al., 2001a; Schaffeld et al., 2002a; Schaffeld et al., 2002b).

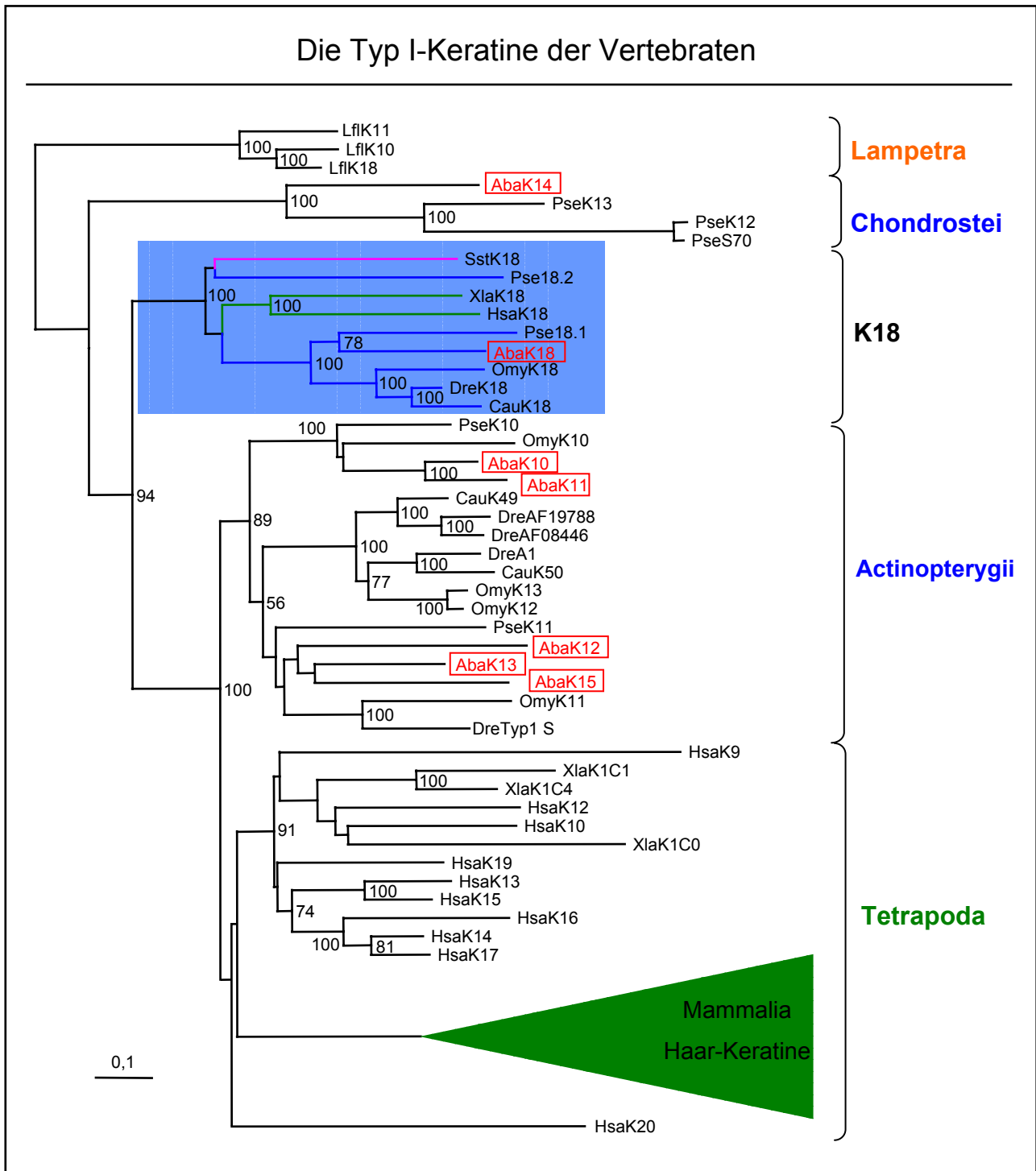
Eine Berechnung der Sequenzidentitäten (Tab. 8) zeigte weiter, daß die Rod-Domäne von AbaK14 zu den übrigen Typ I-Keratinen vom Stör nur eine Identität von rund 50% aufweist. Die Werte ändern sich auch nicht signifikant wenn das gesamte Protein betrachtet wird. Bedenkt man, daß die Funktion der IF-Proteine im Gewebe durch ihre Head- und Tail-Domäne bestimmt wird (Hanukoglu und Fuchs, 1982; Hanukoglu und Fuchs, 1983; Nagle, 1988; Steinert und Roop, 1988), scheint es sich nicht um ein besonders spezialisiertes Protein, sondern um ein recht altertümliches zu handeln.

Daß es sich bei den Keratinen des Störs und Flösselhechts nicht um völlig verschiedene Keratine handelt, die nur wegen ihrer (unabhängig) abgeleiteten Sequenzen zusammenstehen, verdeutlichen die Sequenzidentitäten (Tab. 8). AbaK14 zeigt zu dem IF-Proteinen PseK13 des Flösselhechts die mit Abstand größte Identität. Auch die Identitäten zu PseK12 und PseK70 liegen um ~5% höher als zu den anderen Typ I-Keratinen des Störs, dennoch konnte ich kein vereinendes Sequenzmotiv zwischen diesen IF-Proteinen finden. Ähnlich den K18-Orthologen weisen sie über die gesamte Sequenz Differenzen zu den übrigen Typ I-Keratinen auf, ohne daß ein bestimmtes Merkmal festgemacht werden kann.

Interessant wäre festzustellen, ob sich die Proteine im Expressionsmuster gleichen. Da aber diesen Sequenzen des Flösselhechts noch keine Proteinflecken in 2D-Gelen von Cytoskelettpräparationen zugewiesen werden konnten, ist der Vergleich zur Zeit noch nicht möglich.

Hingegen konnte AbaK14 beim Stör im Flossengewebe identifiziert werden. Wie die biochemischen Daten zeigen, weisen AbaK18 und AbaK14 sehr ähnliche Wandereigenschaften auf (siehe Abb. 13). Vielleicht ist AbaK14 beim Stör der Partner von AbaK8a und stellt mit diesem das erste heterologe Paar, möglicherweise beschränkt auf wenige Zellen der Epidermis. Normalerweise wird während der Ontogenese von Amphibien und Säugern das erste Keratinpaar von den beiden „S“-Keratinen K8 und K18 gebildet (Franz und Franke, 1986; Bader et al., 1988; Fouquet, 1991). AbaK14 wurde bisher als Typ I<sub>E</sub>-Keratin eingestuft, da der einzige zur Zeit identifizierte Expressionsort das Flossengewebe ist. Sollte AbaK14 tatsächlich der Partner von AbaK8a und auf spezialisierte Zellen der Epidermis beschränkt sein, könnte es sich aber um ein „S“-Keratin handeln.

Ob ein Zusammenhang dieses Keratins (und vielleicht auch der Keratine des Flösselhechts) mit der Ausbildung der Ganoidschicht besteht, kann mit den vorhandenen Daten nur vermutet werden. Indizien dafür wären, daß beim Flösselhecht, der eine deutlich stärkere Ganoidschicht als der Stör aufweist (Marinelli und Strenger, 1953), bereits drei entsprechende Keratine gefunden wurden. Außerdem konnten solche Keratine bisher bei keinem der sonst untersuchten ganoidfreien Fische identifiziert werden.



**Abb. 17** Molekularer Stammbaum mit 61 Typ I-Keratinen der Vertebraten nach einem multiplen Alignment der Rod-Domänen. Als Außengruppe dienten die Sequenzen eines Agnathen (Flußneunauge). Die Distanzmarkierung unten links beschreibt 0,1 Aminosäuresubstitutionen pro Position (nach JTT). Die Zahlen an den Verzweigungen geben die Bootstrap-Werte an. Werte unter 74% wurden nicht angegeben. Blau hinterlegt wurden die K18-orthologen Proteine der gnathostomen Vertebraten. Das K18-orthologe Protein des Katzenhais (Sst) wurde mit einem rosa Ast hervorgehoben, die der Strahlenflosser mit blauen und die der Landwirbeltiere (Tetrapoda) entsprechend mit grünen. Mit den gleichen Farben wurden auch die Taxa-Bezeichnungen versehen, außerdem wurden die Agnathen mit orange markiert. Die Sequenzen vom Stör wurden mit rot markiert und umrandet. Die monophyletische Gruppe der Typ I-Haarkeratine der Mammalia wurden zu einem blaß-grünen Dreieck zusammengefaßt. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: **Aba**, *Acipenser baeri*, Stör; **Cau**, *Carassius auratus*, Goldfisch; **Dre**, *Danio rerio*, Zebraquärling; **Hsa**, *Homo sapiens*, Mensch; **Lfl**, *Lampetra fluviatilis*, Neunauge; **Omy**, *Oncorhynchus mykiss*, Regenbogenforelle; **Pse**, *Polypterus senegalus*, Flösselhecht; **Sst**, *Scyliorhinus stellaris*, Katzenhai; **Xla**, *Xenopus laevis*, Krallenfrosch. Die Accession-Nummern der Sequenzen finden sich im Anhang unter F2.

## 2.2.2 Die Stellung der übrigen IF-Sequenzen des Störs im molekularen Stammbaum

Der molekulare Stammbaum der Typ I-Keratine zeigt einen klar abgegrenzten Ast der K18-Orthologen (Abb. 17). Per Definition findet sich auch das als K18-ortholog eingestufte Keratin des Störs in diesem Ast. Dabei zeichnet dieser, mit einer Ausnahme, die klassische Vorstellung des Verlaufs der Evolution nach. Zuerst zweigen die Elasmobranchier ab, dann trennt sich der Ast in zwei Linien, die je zu den Tetrapoden und den Knochenfischen führen. Letztere beinhaltet die Teleosteer sowie basal dazu stehend den Stör und Flösselhecht. Eine Ausnahme stellt die Sequenz PseK18.2 vom Flösselhecht dar, die sich zu der Sequenz des Katzenhais (Sst) stellt. Diese Verzweigung ist allerdings praktisch nicht abgesichert und weitere Sequenzen dürften wohl eine Änderung erbringen.

Alle übrigen Typ I-Keratine der gnathostomen Vertebraten (exklusive AbaK14, PseK12, PseK13 und PseK70) ordnen sich in einem zweiten Ast, der eine Schwestergruppe der K18-Orthologen darstellt (Schaffeld et al., 2002a). Die enthaltenen Typ I<sub>E</sub>, wie auch I<sub>S</sub> Keratine gingen anscheinend aus einem gemeinsamen Keratin-Vorgänger hervor, der bereits vor dem Ursprung der gnathostomen Taxa existierte. Innerhalb dieses Astes ordnen sich wiederum alle Typ I-Keratine der Strahlenflosser, auch des Störs und des Flösselhechts, mit guter Absicherung zusammen. Vermutlich gingen sie aus einem einzigen Keratinvorläufer hervor, direkt nachdem sich die Strahlen- und Fleischflosser getrennt haben (Schaffeld et al., 2002a). Die Position der Keratine vom Stör und vom Flösselhecht innerhalb des Astes der Strahlenflosser untermauert dies. Entsprechend ordnen sich die Keratine der Tetrapoden ebenfalls in einem distinkten Ast. Höchstwahrscheinlich entwickelten sich die Typ I-Keratine der Strahlenflosser also unabhängig von denen der Tetrapoden.

Der Ast der Strahlenflosser zeigt eine Unterteilung in drei einzelne Unteräste. Im Mittleren finden sich keine Sequenzen des Flösselhechts oder Störs. Möglicherweise entstanden die entsprechenden IF-Proteine erst innerhalb der Teleosteer-Linie, aber noch vor der Auftrennung der Salmoniden (Forelle, Omy) und Cypriniiden (Goldfisch, Cau und Zebraäbrbling, Dre), die sich nach fossilen Daten vor 130-140 Millionen Jahren trennten (Benton, 1990). Bisher konnte jedenfalls weder beim Stör noch beim Flösselhecht ein äquivalentes IF-Protein gefunden werden. Die Tatsache, daß die Typ I-Keratine des Störs sonst in allen Strahlenflosser-Bereichen des Baumes vorkommen, spricht für eine frühe und schnelle Radiation dieser Keratine innerhalb der Strahlenflosser.

Die Typ I<sub>E</sub>-Keratine AbaK12, AbaK13 und AbaK15 kommen zusammen in einem Unterast vor. Die Absicherung dieser Verzweigung ist mit Bootstrapwerten deutlich unter 75 sehr schlecht beziehungsweise nicht vorhanden (Felsenstein, 1985). Da die Werte so gering sind, ist zur Zeit keine Aussage über die eigentliche Position dieser Störkeratine möglich. Um zu testen, ob möglicherweise andere IF-Proteine die Auflösung dieser Keratine negativ beeinflussten, berechnete ich Vergleichsbäume nur mit den Sequenzen der Strahlenflossern (nicht abgebildet). Wie zu erwarten war, kam es im Baum zu starken Umstellungen, wobei sich die Bootstrap-Werte nicht signifikant erhöhten.

Auch die Berechnung der Distanzen mit andere Matrizen (Dayhoff PAM, Kimura) brachten keine Verbesserung. Der Stammbaum bleibt (vorerst) an dieser Stelle schlecht aufgelöst.

Klar ist damit zur Zeit, daß diese Störsequenzen -mit guter Absicherung- innerhalb der nicht-K18-orthologen Typ I-Keratine der Strahlenflosser stehen. Sie gehören auch nicht zu den beiden übrigen Unterästen, da diese in sich ebenfalls gut abgesichert sind. Wahrscheinlich erbringen weitere Daten vom Flösselhecht eine neue Einordnung dieser Sequenzen und vielleicht neue Gruppen von Ästen.

### 2.2.3 Einigen Typ I-Keratinen fehlt ein typisches Sequenzmotiv in der Tail-Domäne

Die beiden Typ I-Keratine AbaK10 und AbaK11 ordnen sich im molekularen Stammbaum zusammen mit OmyK10 und PseK10 in einem separaten Unterast innerhalb der Strahlenflosser (Abb. 17). Die Absicherung dieser Gruppe ist mit einem Bootstrap-Wert von 100 sehr gut.

Vergleicht man die gesamte Aminosäureabfolge dieser IF-Proteine mit den übrigen Typ I-Keratinen, zeigt sich ein Unterschied. Die restlichen Typ I-IF-Proteine haben am Ende ihrer Tail-Domäne einen Sequenzblock, der mit Abwandlungen ein Motiv der Art <VDGKVVSS> enthält. Dieser Block findet sich nicht nur bei den Strahlenflossern, sondern auch bei den meisten der bisher vorliegenden Sequenzen von Mensch und Krallenfrosch, aber nicht beim Neunauge *Lampetra*, einem Agnathen (Schultess, 2001).

Bei AbaK10, AbaK11, PseK10 und OmyK10 hingegen fehlt dieser Abschnitt vollständig, die Sequenzen enden hier früher. Für die Einstufung im molekularen Stammbaum ist dieser Abschnitt jedoch nicht verantwortlich, da für die Berechnung nur die Rod-Domänen herangezogen wurden. Dennoch stellt er ein einfach zu prüfendes Merkmal dar.

Den weiter oben besprochenen Keratinen AbaK14, PseK12, PseK13 und PseS70 vom Stör und Flösselhecht fehlt dieses Motiv ebenfalls (Höffling, 2001; Schätzlein, 2001). Dennoch dürfte sich dieser Keratintyp nicht aus solchen IF-Proteinen abgeleitet haben, obwohl dieses Merkmal sehr früh entstanden sein muß, da es sowohl bei einem Teleosteer, dem Menschen, als auch beim Stör und Flösselhecht vorkommt. Eher wahrscheinlich ist, daß diese den Sequenzabschnitt sekundär wieder verloren haben, ähnlich den Nicht-K8-orthologen Typ II-Proteinen (Schaffeld et al., 1998).

In dem beschriebenen Ast bildet die Sequenz von *Ocorhynchus mykiss* (Omy), einem Teleosteer, eine Schwestergruppe zu den beiden Sequenzen vom Stör. Die Absicherung dieser Verzweigung ist aber sehr schlecht und Änderungen durch zusätzliche Sequenzen sind hier zu erwarten. Außerdem weisen die beiden Stör-Proteine zu PseK11 eine stets um 4% größere Identität als OmyK10 auf, ein Indiz dafür, daß sich der Baum an dieser Stelle noch ändern wird (Tab. 8). AbaK10 weist zu AbaK11 sowohl für die Rod-Domäne, als auch für die gesamte Sequenz eine Übereinstimmung von fast 87% auf. Dieser hohe Wert ist ein Hinweis auf eine relativ spät stattgefundene Genduplikation oder, da der Stör tetraploid ist, eine Genomduplikation (Ludwig et al., 2001).

**Tab. 8** Identitätsmatrix der Typ I-Keratine. Die Identitäten wurden mit dem Programm „Mega“ nach dem Modell „p-distance“ berechnet und sind in Prozent Identität angegeben (zur Methode siehe B23.1). Die als Typ I-Keratine identifizierten Sequenzen des Störs (Aba) wurden mit den Typ I-Keratinen vom Flußneunauge (Lfl), Katzenhai (Sst), Flösselhecht (Pse), Regenbogenforelle (Omy), Mensch (Hsa) und Lanzettfischchen (Bla) verglichen. Die untere linke Hälfte ist ein Vergleich über den gesamten Sequenzbereich, die obere rechte Hälfte bezieht sich nur auf den Bereich der konservierten helikalen Rod-Domäne. Da die Sequenz von AbaK13 im Head-Bereich unvollständig ist, wurden Werte die sich auf die gesamte Sequenz beziehen *kursiv* dargestellt, ebenso für PseK13. Die Werte für die Standardabweichungen liegen zwischen 2,0% und 2,9%. Felder der Matrix, die Sequenzen des Störs betreffen, sind grau unterlegt. Werte, die zwei Sequenzen von *Acipenser baeri* direkt miteinander vergleichen sind zusätzlich rot hervorgehoben. Die Accession-Nummern der Sequenzen finden sich im Anhang unter F2.

Rod	Rod																		
	AbaK10	AbaK11	AbaK12	AbaK13	AbaK14	AbaK15	AbaK18	LflK18	SstK18	PseK18.1	OmyK18	HsaK18	PseK10	PseK11	PseK13	OmyK10	OmyK11	HsaK10	BlaE1
Gesamt																			
AbaK10	--	86,5	59,8	71,3	44,6	63,2	49,3	48,0	51,4	47,3	47,6	48,0	77,0	63,9	42,6	73,0	63,2	56,8	30,7
AbaK11	86,9	--	57,4	68,2	43,6	61,1	49,7	46,3	51,4	47,6	47,6	49,0	74,3	63,9	41,9	70,3	59,8	55,1	29,4
AbaK12	59,9	57,9	--	68,9	47,6	63,5	48,0	50,3	49,0	47,6	51,0	46,6	58,4	61,5	43,9	54,7	62,5	53,7	31,4
AbaK13	71,7	68,7	69,0	--	51,0	72,6	51,0	51,0	54,7	48,6	51,4	48,6	67,9	70,6	44,6	64,9	67,9	57,8	33,4
AbaK14	44,8	43,8	48,5	51,9	--	50,3	44,3	49,7	47,3	44,9	47,6	42,6	48,3	50,3	63,9	45,9	44,9	46,3	34,8
AbaK15	63,6	61,6	64,3	73,4	50,5	--	50,7	52,0	55,4	50,0	49,7	51,0	60,1	62,8	43,9	56,4	64,5	56,8	32,4
AbaK18	49,5	49,8	48,8	51,9	44,4	50,5	--	51,0	63,9	72,3	73,0	58,8	51,0	47,3	43,6	48,3	50,0	47,3	34,5
LflK18	48,5	46,8	51,2	51,9	49,8	52,2	51,2	--	51,7	48,6	49,3	50,7	49,0	50,3	45,3	48,6	48,0	48,6	38,5
SstK18	51,5	51,5	49,5	55,2	47,5	55,6	64,3	52,2	--	59,5	57,4	54,7	52,0	48,6	42,6	45,9	51,4	48,3	31,8
PseK18.1	47,8	48,1	48,1	49,2	45,5	50,5	72,4	49,2	59,3	--	65,2	58,8	50,0	44,6	42,9	47,0	47,3	45,9	31,4
OmyK18	47,5	47,5	51,2	51,5	48,1	49,5	72,7	49,5	56,9	64,6	--	60,1	50,0	49,0	41,6	49,0	53,4	46,6	33,4
HsaK18	48,1	49,2	47,5	49,5	42,8	50,8	58,9	50,8	55,2	58,9	59,9	--	49,7	48,6	41,6	46,3	50,7	50,3	31,4
PseK10	77,1	74,7	58,6	68,4	48,5	60,6	51,2	49,5	52,2	50,5	49,8	49,8	--	64,9	44,6	73,0	59,8	60,5	32,4
PseK11	64,0	64,0	62,3	71,4	50,8	63,6	48,1	51,5	49,5	45,5	49,5	49,8	65,3	--	46,6	60,8	63,2	56,1	32,4
PseK13	43,1	42,8	44,8	45,5	63,6	44,8	44,4	45,8	43,8	43,8	42,1	42,4	45,1	47,5	--	42,6	40,2	42,9	32,1
OmyK10	73,1	70,4	55,6	65,7	46,1	56,2	48,1	48,8	46,1	47,1	48,8	46,1	73,1	61,3	43,1	--	62,5	57,4	30,1
OmyK11	63,3	59,9	63,3	68,7	45,1	64,6	50,5	48,5	52,2	47,8	53,5	51,2	59,9	64,0	41,8	62,6	--	53,4	31,1
HsaK10	57,6	55,9	54,5	58,6	46,1	57,6	47,8	49,2	48,8	46,8	46,8	50,8	61,3	56,9	43,8	57,9	54,2	--	33,1
BlaE1	31,3	30,0	32,3	34,3	35,4	33,0	35,0	39,1	32,3	32,0	33,7	32,0	33,0	33,3	33,0	31,0	32,0	33,7	--

Um eine Referenz für die Zahlenwerte der Identitäten zu haben, wurde ein biochemisch als Typ I eingestuftes Keratin eines Cephalochordaten (*Branchiostoma lanceolatum*, Bla) (Karabinos et al., 1998) zum Vergleich mitberechnet (Tab. 8). Die ermittelten Werte liegen stets um 32%. Dabei ist es egal, ob die gesamte Sequenz oder nur die Rod-Domäne berücksichtigt wird oder ob es sich um ein K18-orthologes Protein handelt. Diese niedrigen Werte spiegeln die evolutive Distanz zwischen den Cephalochordaten und den Vertebraten wider.

Die Identitäten erlauben keine Aussage darüber, ob der Stör oder der Flösselhecht näher zu den höheren Vertebraten steht.

## 2.3 Die Typ II-Keratine

Die K8-orthologen Keratine der Vertebraten weisen im Gegensatz zu den K18-Orthologen mindestens ein gut konserviertes Sequenzmotiv auf. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben (siehe C4.2 mit Abb. 7) findet sich in der Head-Domäne ein schwach und in der Tail-Domäne ein stark konserviertes Sequenzmotiv. Letzteres tritt innerhalb der Typ II-Keratine nur bei den K8-Orthologen auf. Interessanterweise findet sich das Motiv, wenn auch in abgewandelter Form, auch außerhalb der Typ II-Proteine wieder. Es kann bei allen bisher bekannten Vertretern der Typ III-IF-Proteine, den A- und D-IF-Proteinen der Tunicaten (Riemer und Weber, 1998; Wang et al., 2000) und zwei K $\gamma$ -Proteinen von *Lampetra* (Schultess, 2001) gefunden werden.

### 2.3.1 Ist AbaK8a ein K8-orthologes Protein?

Wie im Ergebnisteil unter C4.2 erläutert, zeigt der cDNA-Klon *abak8a* einige Besonderheiten. Die Sequenz weist hinter dem Stop-Codon das einleitend beschriebene typische 8er-Motiv auf. Das Keratin ordnet sich im Stammbaum aber nicht zu den K8-Orthologen der Strahlenflosser, sondern zu den Keratinen des Katzenhais (Sst). Da der Baum nur mit der Rod-Domäne berechnet wird, ist das Fehlen des Motivs in der Aminosäuresequenz des Proteins dafür nicht verantwortlich. Die Sequenz an sich zeigt so wenig Übereinstimmung mit den Keratinen der Strahlenflosser, daß sie völlig außerhalb deren Astes angesiedelt wird.

Dies zeigt auch eine Berechnung der Sequenzidentitäten (Tab. 9). AbaK8a weist kaum mehr Identität zu dem K8-Orthologen des Flösselhechts (PseK8) auf, als zu dem des Menschen (HsaK8), obwohl sich beide stammesgeschichtlich näher stehen. Außerdem zeigen die Keratine AbaK1 und AbaK2 deutlich höhere Identität zu den K8-Orthologen der anderen Wirbeltiere, als Aba-K8a.

Bei der Zuordnung von AbaK8a zu den IF-Proteinen des Katzenhais (Sst) im Stammbaum handelt es sich wahrscheinlich um eine „long branch attraction“ (Felsenstein, 1978). Der Ast ist mit einem Bootstrap-Wert von 60% praktisch nicht abgesichert. Wie außerdem die Tabelle der Sequenzidentitäten zeigt (Tab. 9), weist AbaK8a zu dem K8-Orthologen des Katzenhais nur 38% Identität für die Rod-Domäne und 30% für die gesamte Sequenz auf. Diese Werte liegen damit sehr deutlich unter denen der Strahlenflosser, zu denen sich das Protein im Baum aber nicht stellt.

**Tab. 9** Identitätsmatrix der Typ II-Keratine. Die Identitäten wurden mit dem Programm „Mega“ nach dem Modell „p-distance“ berechnet und sind in Prozent Identität angegeben (zur Methode siehe B23.1). Die als Typ II-Keratine identifizierten Sequenzen des Störs (Aba) wurden mit den Typ II-Keratinen vom Flußneunauge (Lfl), Flösselhecht (Pse), Katzenhai (Sst), Regenbogenforelle (Omy), Zebraärbling (Dre), Krallenfrosch (Xla) und Mensch (Hsa) verglichen. Die untere linke Hälfte ist ein Vergleich über den gesamten Sequenzbereich, die obere rechte Hälfte bezieht sich nur auf den Bereich der konservierten helikalen Rod-Domäne. Da die Sequenz von AbaK1 im Head-Bereich unvollständig ist, wurden Werte die sich auf die gesamte Sequenz beziehen *kursiv* dargestellt. Die Werte für die Standardabweichungen liegen zwischen 2,0% und 2,9%. Felder der Matrix, die Sequenzen des Störs betreffen, sind grau unterlegt. Werte, die zwei Sequenzen von *Acipenser baeri* direkt miteinander vergleichen sind zusätzlich rot hervorgehoben. Die Accession-Nummern der Sequenzen finden sich im Anhang unter F2.

Rod	Rod													
	AbaK1	AbaK2	AbaK8a	LflK8	PseK8	SstK8	OmyK8b	DreK8	XlaK8	HsaK8	LflK1	OmyK1	OmyK3	HsaK2
Gesamt														
AbaK1	--	82,8	47,6	37,7	71,7	40,1	76,4	73,0	68,1	65,4	49,2	74,3	74,3	43,6
AbaK2	78,4	--	48,7	44,2	78,4	41,9	84,7	82,4	74,3	71,7	53,0	86,3	87,4	48,7
AbaK8a	38,2	39,2	--	25,3	50,3	38,3	48,7	50,9	45,3	48,1	30,0	46,5	47,0	25,3
LflK8	30,7	36,1	20,8	--	44,8	30,7	44,8	43,0	37,1	37,1	45,3	42,5	40,1	17,3
PseK8	69,0	76,3	43,2	37,7	--	49,2	85,5	84	73,4	75,9	49,8	79,2	79,2	49,2
SstK8	31,8	34,0	30,7	23,8	42,7	--	48,7	49,8	44,2	43,6	44,8	44,8	43,6	24,6
OmyK8b	72,0	80,1	41,2	36,6	82,4	40,7	--	93,5	76,8	75,5	52,5	85,5	87,8	50,3
DreK8	69,7	77,7	43,7	35,6	81,4	42,2	91,0	--	75,1	76,8	51,9	84,0	85,5	48,1
XlaK8	62,7	69,7	39,7	31,8	70,1	36,1	73,1	72,7	--	79,2	50,3	70,4	72,1	53,0
HsaK8	59,9	67,8	40,2	29,6	72	34,5	70,5	73,1	76,6	--	51,4	75,1	75,1	56,6
LflK1	41,2	46,1	23,8	44,2	44,2	37,1	45,6	45,6	45,1	44,7	--	54,6	53	34,6
OmyK1	69,4	84,7	37,7	34,0	76,3	36,1	82,1	80,1	66,7	71,2	48,5	--	93,9	52,5
OmyK3	70,9	85,4	38,2	32,9	75,9	36,1	84,4	82,1	69,7	71,6	46,6	90,7	--	51,9
HsaK2	38,2	47,0	18,3	9,8	46,1	16,4	46,6	47,0	51,7	54,3	28,4	51,2	49,4	--

Die biochemischen Daten lassen vermuten, daß die prominenten Flecken der Identitätsgruppe 5 im 2D-Gel von dem K8-Orthologen des Störs verursacht werden (siehe Ergebnisse C7). Diese Proteinflecken wurden als Typ II identifiziert und finden sich in Präparationen des Mitteldarm und des Magens, aber nicht im Seitenflossengewebe. Sie wurden daher als „S“-Keratine eingestuft und sind damit die einzigen als Typ II<sub>S</sub> identifizierten Keratine des Störs.

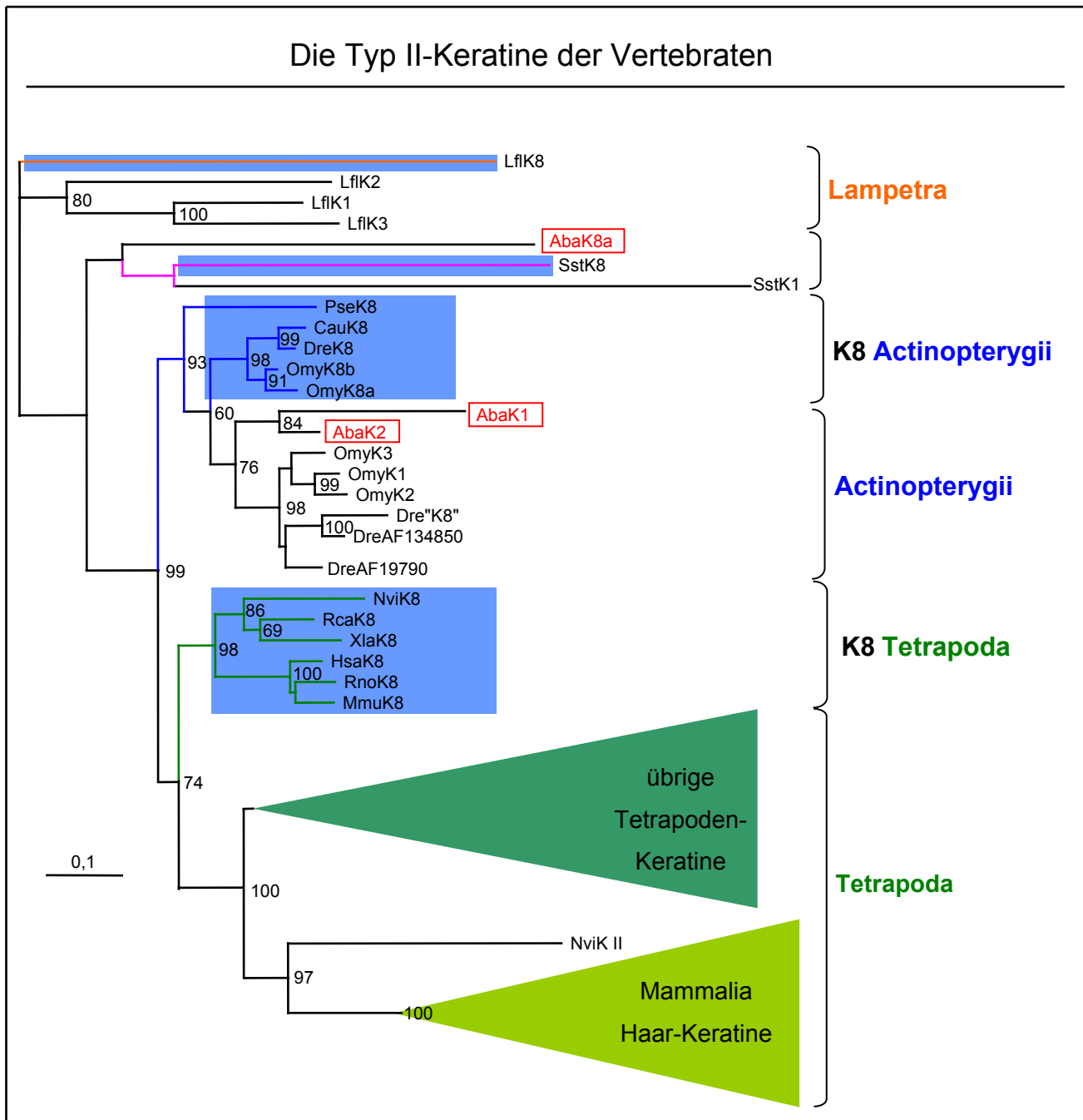
Da sowohl von den Ergebnissen des Agnathen *Lampetra* (Schultess, 2001), als auch des Flösselhechts (Kusche, 1999), erwartet werden kann, daß beim Stör ein K8-orthologes Keratin vorkommt ist es wahrscheinlich, daß die Typ II<sub>S</sub>-Flecken von diesem Protein verursacht werden. Die Daten der MALDI-Analyse ergaben für AbaK8a aber nie mehr als 23% Übereinstimmung für Fragmente dieser Proteinflecken. Dies ist ein weitere Hinweis darauf, daß AbaK8a nicht das K8-orthologe Protein des Störs ist.

Der Hauptgrund, warum angenommen wurde, daß es sich bei AbaK8a um das K8-Orthologe des Störs handelt, ist das typische Motiv am Ende der Sequenz. Damit stellt sich die Frage, ob es sich bei der cDNA-Sequenz zumindest teilweise um ein Artefakt handelt. Ein Sequenzierungsfehler kann durch das wiederholte Sequenzieren, auch unter Spezialbedingungen, praktisch ausgeschlossen werden. Möglich wäre ein Fehler der *Reversen Transkriptase* bei der Erstellung der cDNA-Bank oder ein Fehler bei der Transkription der mRNA im Organismus. Zur Zeit gibt es jedenfalls keinen Beweis dafür, daß die für AbaK8a codierende mRNA im Organismus nicht so vorkommt. Es sieht so aus, als ob das K8-Motiv für das Protein abgeschaltet wurde, aber noch im Gen enthalten ist. Abschließende Sicherheit kann hier aber nur die Sequenzierung des entsprechenden Genes geben.

Da mit AbaK14 und drei Sequenzen vom Flösselhecht (Pse) (Höffling, 2001; Schätzlein, 2001) Typ I-Keratine vorliegen, die vermutlich basal zu den übrigen Typ I-IF-Proteinen stehen, drängt sich die Frage auf, ob es sich bei AbaK8a ähnlich verhält? Vielleicht steht dieses Protein tatsächlich basal zu den übrigen Typ II-Keratinen, aber außerhalb des Astes der Knorpelfische. Um die Typ I und Typ II-Stammbäume vergleichen zu können, sind allerdings, so weit überhaupt vorhanden, noch Typ I-Keratine vom Katzenhai beziehungsweise Typ II-Keratine vom Flösselhecht (ähnlich basal wie PseK12 und PseK13) nötig. Um den Gedanken der Diskussion von AbaK14 weiterzuführen, kann überlegt werden, ob es sich bei AbaK8a vielleicht um den Dimerpartner von AbaK14 handelt? AbaK14 wird in der Flosse exprimiert, für AbaK8a konnte der Expressionsort noch nicht bestimmt werden. Bisher konnte keiner der untersuchten Flecken der 2D-Gele mittels MALDI-Analyse der Sequenz zugeordnet werden. Auch dies spricht dafür, die AbaK8a-Sequenz mit Vorbehalt zu betrachten.

### **2.3.2 Der molekularen Stammbaum der Typ II-Keratine**

Die beiden Typ II-Störkeratine AbaK1 und AbaK2 ordnen sich im Stammbaum als Schwestergruppe zu den Nicht-K8-orthologen Typ II-Keratinen der Teleosteer. Es findet sich bei den höheren Knochenfischen also kein Äquivalent zu diesen IF-Proteinen des Störs. Dies spricht für eine frühe Aufspaltung der Keratine und daß die Ausweitung der Typ II-Keratine der Strahlenflosser erst innerhalb der Teleosteer stattgefunden hat. Die Verzweigung in Teleosteer und Stör ist mit einem Bootstrap-Wert von 76 nur schwach abgesichert. Dafür zeigen aber die Äste mit den Störsequenzen, beziehungsweise der Teleosteer an sich mit 84 und 98% eine gute bis sehr gute Absicherung, sie bestätigen also diese Aufteilung. Zur Bestätigung dieser Verzweigungen sind weitere Typ II-Keratinsequenzen, insbesondere vom Flösselhecht, von Nöten.



**Abb. 18** Molekularer Stammbaum mit 59 Typ II-Keratinen der Vertebraten nach einem multiplen Alignment der Rod-Domänen. Als Außengruppe dienten die Sequenzen eines Agnathen (Flußneunauge). Die Distanzmarkierung unten links beschreibt 0,1 Aminosäuresubstitutionen pro Position (nach JTT). Die Zahlen an den Verzweigungen geben die Bootstrap-Werte an. Werte unter 74% wurden nicht angegeben. Die K8-orthologen Proteine der Vertebraten wurden mit blauen Rechtecken hinterlegt und die Äste farblich hervorgehoben. Mit orange wurde das Flußneunauge (Lfl) markiert, mit rosa der Katzenhai (Sst), mit blau die Strahlenflosser und mit grün die Landwirbeltiere (Tetrapoden). Die Bezeichnungen der Taxa wurden in den gleichen Farben hervorgehoben. Die Sequenzen vom Stör wurden mit rot markiert und umrandet. Monophyletische Gruppen von Typ I-Keratinen der Tetrapoden wurden zu grünlichen Dreiecken zusammengefaßt. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: **Aba**, *Acipenser baeri*, Stör; **Cau**, *Carassius auratus*, Goldfisch; **Dre**, *Danio rerio*, Zebraquappe; **Hsa**, *Homo sapiens*, Mensch; **Lfl**, *Lampetra fluviatilis*, Neunauge; **Mmu**, *Mus musculus*, Maus; **Nvi**, *Notophthalmus viridescens*, Wassermolch; **Omy**, *Oncorhynchus mykiss*, Regenbogenforelle; **Pse**, *Polypterus senegalus*, Flösselhecht; **Rca**, *Rana catesbeiana*, Ochsenfrosch; **Rno**, *Rattus norvegicus*, Ratte; **Sst**, *Scyliorhinus stellaris*, Katzenhai; **Xla**, *Xenopus laevis*, Krallenfrosch. Die Accession-Nummern der Sequenzen finden sich im Anhang unter F2.

Der phylogenetische Baum zeigt, mit Ausnahme von AbaK8a, eine Einteilung in drei distinkte Äste, die jeweils die Typ II-Keratine vom Hai, den Strahlenflossern und den Tetrapoden umfassen, wobei die Tetrapoden den Strahlenflossern mit sehr guter Absicherung als Schwestergruppe gegenüberstehen. Die jeweiligen Äste trennen sich direkt in die K8-Orthologen und die übrigen Typ II-Keratine (Schaffeld et al., 2002b). Bei den Tetrapoden ist diese Verzweigung mit 74% relativ schlecht abgesichert. Dafür sind aber die Unteräste der K8-Orthologen und der übrigen Tetrapoden-Keratine mit 98% beziehungsweise 100% sehr gut abgesichert. Diese Aufteilungen zeigen, daß die K8-Keratine einen höheren Verwandtschaftsgrad zu den übrigen Typ II-Keratinen der eigenen Wirbeltierklasse besitzen, als zu den K8-Orthologen der anderen Wirbeltierklassen. Die Typ II-Keratine sind vermutlich nicht aus einer Typ II<sub>E</sub>-Wurzel entstanden, sondern offenbar mehrfach aus einem K8-Vorläufer evolviert. Dabei ist das typische Sequenzmotiv der K8-Orthologen in der Tail-Domäne verlorengegangen (Schaffeld et al., 2002b). Bei allen bisher bekannten Typ II-Keratinen die Nicht-K8-Ortholog sind, fehlt diese Motiv. Es stellt zusammen mit einer ausschließlichen Expression in einfachen Epithelien und einer basalen Position im Stammbaum das Hauptmerkmal der K8-Orthologen (Schaffeld et al., 1998).

Die unterschiedlichen Stammbäume der Typ I und II-Keratine (siehe Abb. 17 und Abb. 18) verdeutlichen, daß, obwohl sie stets koexprimiert werden und obligat Heterodimere bilden (Hatzfeld und Franke, 1985; Coulombe und Fuchs, 1990; Steinert, 1990; Hatzfeld und Weber, 1990a), ihre Phylogenie offensichtlich unterschiedlich verlaufen ist.

Die K8-orthologe Sequenz des Flösselhechts (Pse) (Schätzlein, 2001) ordnet sich basal zu allen Typ II-Keratinen der Strahlenflosser. Entweder unterliegt die Sequenz einer „long branch attraction“, wofür die schwachen Bootstrap-Werte der folgenden Verzweigung sprechen, oder sie ist tatsächlich dem gemeinsamen Typ II-Vorfahren aller Strahlenflosser am ähnlichsten. Für den letzten Punkt spricht die allgemein basale Stellung der Flösselhechte im Stammbaum der Strahlenflosser. Zur Absicherung oder Widerlegung der Position von PseK8 sind weitere K8-Sequenzen notwendig, insbesondere vom K8-Orthologen des Störs.

## 2.4 Die Typ III-IF Proteine Desmin und Vimentin

Die molekularen Stammbäume von Desmin und Vimentin zeichnen mit sehr guten Absicherungen das klassische Konzept der Vertebraten-Evolution nach (Abb. 19). Sequenzen des Agnathen *Lampetra* bilden die Aussengruppen (Schultess, 2001). Die erste Verzweigung beinhaltet die Trennung der Knorpel- und Knochenfischen. Die Letzteren trennten sich anschließend in die Strahlenflosser und Fleischflosser, aus denen dann die Tetrapoden hervorgingen. Bei den Tetrapoden stehen die Sequenzen des Krallenfroschs (Xla) basal zu den übrigen Tetrapodenproteinen. Im Ast der Strahlenflosser stehen der Stör (Aba) und der Flösselhecht (Pse) basal zu den Teleosteern.

Die exakten Positionen der letzteren beiden unterscheiden sich bei Desmin und Vimentin. Das Stör-Desmin bildet zusammen mit dem Desmin vom Flösselhecht (Pse) einen eigenen Ast. Bei Vimentin hingegen steht der Flösselhecht basal zum Stör. Diese Verzweigungen sind mit Bootstrap-Werten von 98 und 87% gut abgesichert.

Die unterschiedliche Einordnung von Desmin und Vimentin spiegelt exemplarisch die Problematik der Stör- und Flösselhecht-IF-Proteine wider. An Hand deren Positionen in den molekularen Stammbäumen und den Sequenzidentitäten kann nicht endgültig bestimmt werden, welche Taxa basaler abzweigt oder ob die beiden Familien gar eine monophyletische Gruppe bilden. Diese Frage ist in der Literatur umstritten und wird unterschiedlich diskutiert (Siewing, 1985; Fiedler, 1991; Nelson, 1994). Ein Vergleich wird auch dadurch erschwert, daß beim Stör das K8-orthologe Protein bisher nicht sequenziert wurde und beim Flösselhecht Daten von Typ II-Keratinen fehlen.

Tendenziell läßt sich bisher nur feststellen, daß mit Ausnahme von AbaK14 keine Störsequenz basal zu einer Sequenz des Flösselhechts steht. Entweder bilden die Sequenzen eine Schwestergruppe, wie bei den K18-Orthologen (siehe Abb. 17) und beim Desmin (Abb. 19) oder die Flösselhechtsequenz steht basal, wie bei den Nicht-K18-orthologen Typ I-Keratinen und Vimentin. Außerdem konnten beim Stör Keratine mit großer Wahrscheinlichkeit auch in mesenchymal abgeleiteten Zellen nachgewiesen werden (vgl. D1), was einem Übergang zum „Expressionsmuster der Teleosteer“ entspricht. Der Flösselhecht hingegen zeigt „noch“ ein Muster wie es beim Neunauge (Schultess, 2001), dem Katzenhai (Schaffeld et al., 1998) und den Tetrapoden gefunden wurde. Diese Punkte sprechen für eine basalere Stellung des Flösselhechts.

Sollten zu den basalen Typ I-Keratinen AbaK14, PseK12, PseK13 und PseK70 von Stör und Flösselhecht keine äquivalenten Keratine in den anderen Wirbeltieren gefunden werden, könnte dies ein Hinweis auf die Monophylie der beiden Taxa sein.

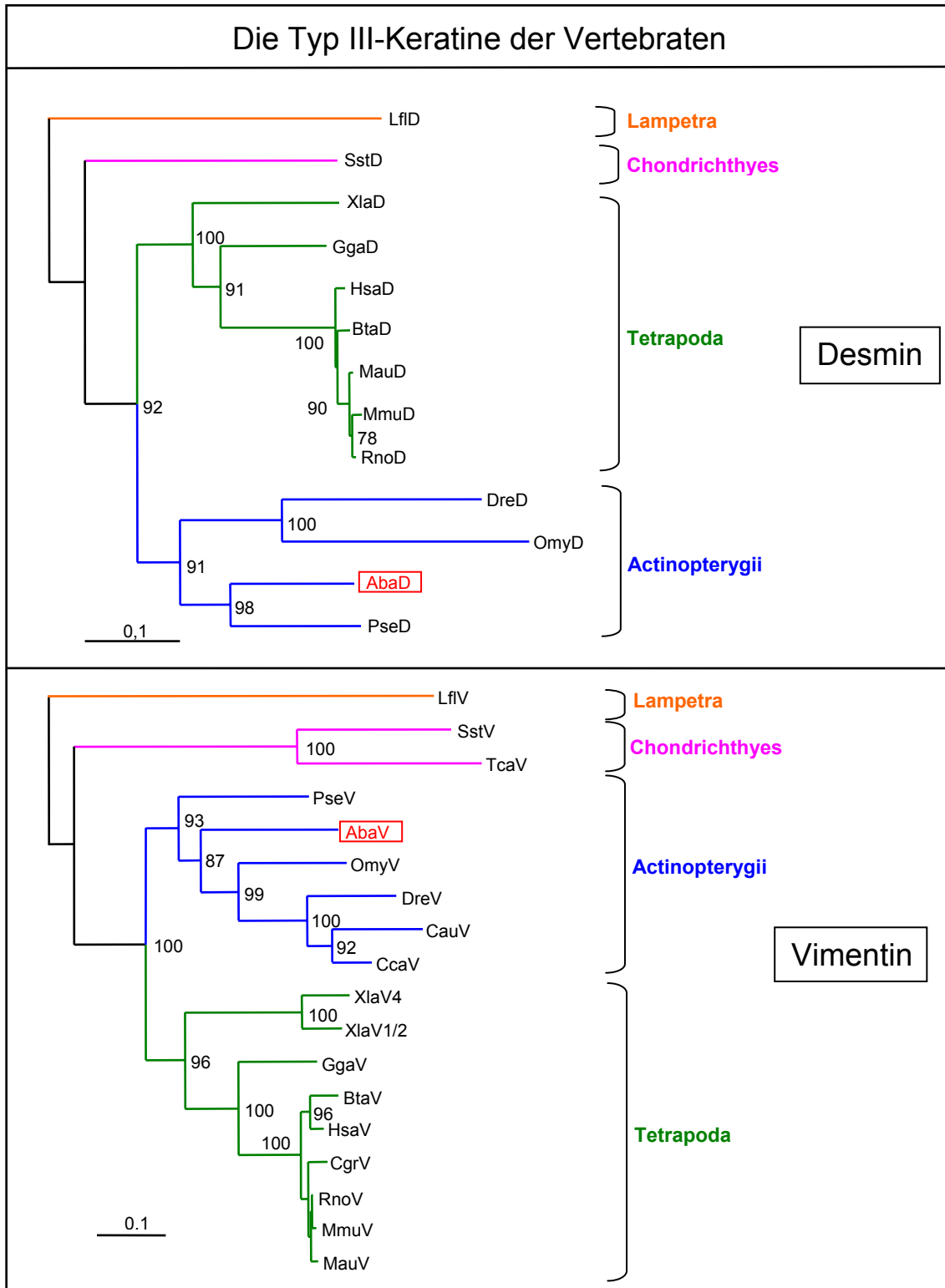


Abb. 19 Legende: siehe nächste Seite

**Abb. 19** (vorhergehende Seite) Molekulare Stammbäume der Typ III-IF-Proteinen Desmin und Vimentin der Vertebraten nach einem multiplen Alignment mit 13 Desmin bzw. 18 Vimentin-Gesamtsequenzen. Die Distanzmarkierungen unten links beschreiben 0,1 Aminosäuresubstitutionen pro Position (nach JTT). Die Zahlen an den Verzweigungen geben die Bootstrap-Werte an. Werte unter 74% wurden nicht angegeben. Die Äste vom Flußneunauge (Lfl) wurden orange markiert, die der Knorpelfische (Sst und Tca) mit rosa. Mit blau wurden die Äste der Strahlenflosser (Actinopterygii) und mit grün die der Landwirbeltiere (Tetrapoden) hervorgehoben. Für die Bezeichnungen der Taxa wurden die gleichen Farben benutzt. Die Sequenzen des Störs wurden mit rot markiert und umrandet. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: **Aba**, *Acipenser baeri*, Stör; **Bta**, *Bos taurus*, Rind; **Cau**, *Carassius auratus*, Goldfisch; **Cca**, *Cyprinus carpio*, Karpfen; **Cgr**, *Cricetulus griseus*, Hamster; **Dre**, *Danio rerio*, Zebrafisch; **Gga**, *Gallus gallus*, Huhn; **Hsa**, *Homo sapiens*, Mensch; **Lfl**, *Lampetra fluviatilis*, Neunauge; **Mau**, *Mesocricetus auratus*, Goldhamster; **Mmu**, *Mus musculus*, Maus; **Omy**, *Oncorhynchus mykiss*, Regenbogenforelle; **Pse**, *Polypterus senegalus*, Flösselhecht; **Rno**, *Rattus norvegicus*, Ratte; **Sst**, *Scyliorhinus stellaris*, Katzenhai; **Tca**, *Torpedo californica*, Zitterrochen; **Xla**, *Xenopus laevis*, Krallenfrosch. Die Accession-Nummern der Sequenzen finden sich im Anhang F2.

### 2.4.1 Desmin und Vimentin

Desmin wird in allen Muskeltypen exprimiert. Es umgibt dort die Z-Scheiben, verbindet sie und integriert den kontraktilem Apparat mit dem Sarkolemm und dem Kern (Capetanaki et al., 1997). Versuche mit Mäusen, denen eine Nullmutation in das Desmin-Gen eingefügt wurde (desmin-knock-out), zeigten eine deutlich schwächere Integrität der Gewebe (Li et al., 1996; Li et al., 1997). In Zellkultursystemen bewirkte das Fehlen von Desmin hingegen eine Veränderung der frühen Entwicklung von Skelett- und glatten Muskelzellen (Weitzner et al., 1995). Die Evolution der extrem leistungsfähigen Muskulatur der Wirbeltiere ist offenbar eng mit der des Desmins verknüpft.

Seine Bedeutung wird durch den sehr hohen Konservierungsgrad der Sequenz quer durch die Evolution der Vertebraten unterstrichen. Wie aus einer Berechnung von Sequenzidentitäten für Desmine und Vimentine verschiedener Vertebraten zu ersehen ist, weist das Desmin des Störs mit den anderen Vertebraten-Desminen über die gesamte Sequenz eine Identität von 67 bis 89% auf (Tab. 10). Für die Rod-Domäne steigen die Werte nochmals um 1-2% an. Solche hohen Identitäten finden sich bei den Keratinen nur innerhalb einer Wirbeltierklasse.

Ein weiteres Indiz dafür, daß Desmin langsamer evolvierte als Vimentin, sind die Identitätswerte zu einem als Typ III-homolog eingestuften IF-Protein des Tunicaten *Styela* (Riemer und Weber, 1998). Für fast alle Desmine liegen sie um 2-4% höher als für die Vimentine.

**Tab. 10** Identitätsmatrix der Typ III-IF-Proteine. Die Identitäten wurden mit dem Programm „Mega“ nach dem Modell „p-distance“ berechnet und sind in Prozent Identität angegeben (zur Methode siehe B23.1). Die als Desmin und Vimentin identifizierten Sequenzen des Störs (Aba) wurden mit Desmin und Vimentin-Proteinen vom Flußneunauge (Lfl), Katzenhai (Sst), Flösselhecht (Pse), Regenbogenforelle (Omy), Krallenfrosch (Xla) und Mensch (Hsa) verglichen. Als Referenz diente eine als Typ III-homolog eingestufte Sequenz des Tunicaten *Styela clava* (Scl). Da die Desmin-Sequenz vom Neunauge (LflD) in der Head- und Tail-Domäne unvollständig ist, wurden Werte, welche die gesamte Sequenz betreffen, kursiv dargestellt. Die untere linke Hälfte ist ein Vergleich über den gesamten Sequenzbereich, die obere rechte Hälfte bezieht sich nur auf den Bereich der konservierten helikalen Rod-Domäne. Die Werte für die Standardabweichungen liegen zwischen 1,7% und 2,9%. Felder der Matrix, die Sequenzen des Störs betreffen, sind grau unterlegt. Werte, die zwei Sequenzen von *Acipenser baeri* direkt miteinander vergleichen, sind zusätzlich rot hervorgehoben. Die Accession-Nummern finden sich im Anhang unter F2.

Rod		AbaV	LflV	SstV	PseV	OmyV	XlaV4	HsaV	AbaD	LflD	SstD	PseD	OmyD	XlaD	HsaD	SclA1
Gesamt																
<b>AbaV</b>	--	71,1	67,9	84,6	83,9	82,3	81,3	67,2	63,6	70,5	68,2	66,6	67,5	68,5	46,2	
<b>LflV</b>	68,7	--	64,6	70,2	67,5	68,5	71,1	68,2	65,9	70,5	70,5	68,2	69,8	73,1	47,5	
<b>SstV</b>	64,9	60,3	--	72,1	69,2	71,1	72,1	63,0	60,7	64,3	64,3	63,3	63,9	63,9	44,9	
<b>PseV</b>	82,2	67,2	69,3	--	84,6	82,0	87,2	68,5	63,3	72,5	71,1	69,5	70,5	69,8	48,2	
<b>OmyV</b>	83,0	65,5	66,1	81,9	--	80,0	82,3	65,9	63,9	69,2	68,2	65,2	66,9	66,9	46,9	
<b>XlaV4</b>	79,6	65,5	67,2	78,2	77,0	--	83,6	66,2	62,0	68,5	68,5	66,6	69,8	68,5	45,9	
<b>HsaV</b>	79,9	68,4	68,4	84,5	79,9	82,8	--	71,5	66,2	74,1	73,1	71,1	74,1	74,1	47,9	
<b>AbaD</b>	64,9	67,0	60,9	66,7	64,1	64,1	69,3	--	67,5	80,0	90,8	81,6	83,9	84,3	48,5	
<b>LflD</b>	60,9	63,5	58,6	61,2	62,4	58,3	62,6	67,5	--	70,8	66,6	65,2	68,5	70,8	47,5	
<b>SstD</b>	67,8	68,7	61,2	69,8	66,4	66,7	70,7	79,0	68,7	--	81,3	76,7	83,0	83,6	48,9	
<b>PseD</b>	66,1	69,0	61,5	69,3	65,8	65,8	69,8	89,4	66,4	80,5	--	83	85,9	84,3	49,2	
<b>OmyD</b>	63,8	66,1	59,2	66,7	62,6	64,4	67,8	79,9	63,8	75,6	81,3	--	77,7	79,3	48,2	
<b>XlaD</b>	65,2	68,1	60,9	67,8	64,7	67,0	70,7	83,9	67,5	81,9	85,3	76,1	--	86,6	49,5	
<b>HsaD</b>	65,8	71,0	60,3	67,2	64,4	64,9	70,7	83,9	69,5	81,9	83,6	77,9	87,1	--	50,2	
<b>SclA1</b>	43,7	45,4	42,8	45,7	44,5	43,4	45,4	47,4	46,6	46,6	47,4	46,6	47,1	48,3	--	

Vimentin ist ein hochkonserviertes IF-Protein, dessen Primärstruktur zwischen Landwirbeltieren, Teleostern, Elasmobranchiern und Agnathen eine sehr hohe Ähnlichkeit aufweist (Herrmann et al., 1996b; Schultess, 2001; Schaffeld et al., 2001b) (Tab. 10). Es stellt das am weitesten verbreitete Typ-III-Protein dar. Während Desmin nur in Muskelzellen vorkommt, findet sich Vimentin bei den Landwirbeltieren in allen mesenchymal abgeleiteten Geweben (Moll et al., 1982; Herrmann et al., 1989a) und stellt dort das typische IF-Protein. Bei Teleostern dagegen ist die ausschließliche Expression von Vimentin auf eine wesentlich geringere Anzahl von Zelltypen wie Leukozyten, Pigmentzellen und Augenlinsengewebe beschränkt (Herrmann et al., 1996b; Cerda et al., 1998). Vimentin konnte beim Stör durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit hoher Wahrscheinlichkeit zusammen mit Keratinen in mesenchymal abgeleiteten Zellen nachgewiesen werden (vgl. D1).

## 2.4.2 Desmin und Vimentin weisen Strukturähnlichkeiten auf

Desmin und Vimentin sind wahrscheinlich durch Genduplikation und Diversifizierung aus einem Vorläufergen entstanden. Da Desmin und Vimentin in einem Agnathen identifiziert werden konnten (Schultess, 2001), muß dieses Ereignis vor der Abtrennung der Gnathostomata von den Agnatha stattgefunden haben. Entsprechend ihrer gemeinsam Abstammung weisen sie einige Sequenzmerkmale auf.

So besitzen beide in der Head-Domäne ein Neun-Aminosäuremotiv, das bisher bei allen identifizierten Desminen und Vimentinen gefunden werden konnte (Schaffeld et al., 2001b). So auch beim Stör und beim Flösselhecht (Abb. 20).

Innerhalb der Vimentine der bisher identifizierten Strahlenflosser findet sich im Motiv ein Unterschied zu den übrigen Vertebraten, das erste Lysin (R) ist isofunktionell gegen ein Arginin (K) ausgetauscht. Anscheinend ist diese Änderung des Motivs erst nach der Trennung der Fleisch- und Strahlenflosser aber vor der Trennung der Salmoniden und Cypriniden aufgetreten (vertreten durch Forelle, Omy und Zebraäbrbling, Dre). Bei den bisher bekannten Desminen ist die sechste Position mit einem Threonin (T) stärker konserviert als bei den Vimentinen.

Hsa-V	SSYRRMFGG
Xla-V4	SSYRRIFGG
Dre-V	SSYKRMFGG
Omy-V	SSYKRMFGG
Aba-V	SSYKRMFGG
Pse-V	SSYKRIFGG
Sst-V	STYRRMFAE
Aba-D	SSYRRTFGG
Pse-D	SSYRRTFGG
Hsa-D	SSYRRTFGG
Xla-D	SSYRRTFGG
Dre-D	SSYRRTFGS
Omy-D	SSYRRTFGS
Sst-D	SSYRRTFGG
Lfl-V	SSYRRTFGP

**Abb. 20** Typisches Sequenzmotiv aus neun Aminosäuren in der Head-Domäne von Vimentin (V) und Desmin (D). Bei den bisher identifizierten Strahlenflossern ist das erste Lysin (R) isofunktionell gegen ein Arginin (K) ausgetauscht (grau unterlegt). Bei den bisher bekannten Desminen liegt das Threonin (T) stärker konserviert vor als bei den Vimentinen (grau unterlegt). Es wurden nicht alle bekannten Sequenzen abgebildet. Verwendete Abkürzungen: **Aba**, *Acipenser baeri*, Stör; **Dre**, *Danio rerio*, Zebraäbrbling; **Hsa**, *Homo sapiens*, Mensch; **Lfl**, *Lampetra fluviatilis*, Neunauge; **Omy**, *Oncorhynchus mykiss*, Forelle; **Pse**, *Polypterus senegalus*, Flösselhecht; **Sst**, *Scyliorhinus stellaris*, Katzenhai; **Xla**, *Xenopus laevis*, Krallenfrosch. Die Accession-Nummern finden sich im Anhang unter F2.

Die sequenzierten Vimentine von *Scyliorhinus* und *Torpedo*, zwei Knorpelfischen, weisen am Ende der Tail-Domäne das kleine Motiv <K/RIED> auf, welches sich bei den Vimentinen der restlichen Vertebraten nicht findet (Schaffeld, 2001). Beim Stör finden sich an dieser Position die Aminosäuren <HDD>, womit der Stör vollständig mit den terrestrischen Tetrapoden übereinstimmt. Bei den Sequenzen der Teleosteer (Karpfen, Zebrahärling und Regenbogenforelle) hingegen ist das Histidin <H> gegen ein Lysin <K> beziehungsweise Asparagin <N> ausgetauscht. Die Veränderung des Motives ist anscheinend erst innerhalb der Teleosteer, aber von der Trennung der Salmoniden und Cypriniden entstanden. Eine weitere Gemeinsamkeit der bisher sequenzierten Desmine und Vimentine, auch der des Störs, ist eine sogenannte „Pre-Coil-Domäne“ (Schaffeld, 2001).

Die Daten des Störs, als auch des Flösselhechts, bestätigen bisher identifizierte Sequenzähnlichkeiten von Desmin und Vimentin. Bedingt durch die mittlerweile recht große Anzahl an sequenzierten Desminen und Vimentinen sowie isofunktionellen Austauschen und Rückmutationen an eigentlich konservierten Positionen, wird es aber immer schwieriger Aminosäurepositionen zu finden, die absolut typisch für den einen oder anderen Subtyp sind.

## E Zusammenfassung

Im Rahmen meiner Arbeit wurden erstmals die Intermediärfilament-Proteine (IF-Proteine) des Sibirischen Störs *Acipenser baeri* (Strahlenflosser, Knorpelganoid) kloniert und sequenziert. Aus einer cDNA-Bank konnten die Sequenzen von 13 IF-Proteine gewonnen werden. Von insgesamt zehn Keratinen codieren sieben für Typ I-Keratine und drei für Typ II. Zusätzlich konnten noch Desmin, Vimentin und ein Lamin identifiziert werden. Je einem Typ I- (K13) und einem Typ II-Keratin (K2) fehlen wenige Aminosäuren in der Head-Domäne.

Cytoskelett-Präparationen aus Epidermis, Mitteldarm, Magen und Kieme wurden mittels 2D-PAGE aufgetrennt. Durch Einsatz des CKBB-Test und Immunoblots wurden die verschiedenen Typ I und II-Keratine sowie Desmin und Vimentin identifiziert. Die gewebsspezifische Expression der Keratine ermöglichte zumeist ihre Einteilung in „E“ (epidermal) und „S“ („simple epithelial“).

Die MALDI-MS-Analyse einer 2D-PAGE-Koelektrophorese von Seitenflosse und Mitteldarm zeigte, daß die 34 vorhandenen Proteinflecke auf nur 13 verschiedene IF-Proteine zurückgehen. Neun dieser Flecke konnten Sequenzen zugewiesen werden. Zusammen mit den verbleibenden vier Proteinflecken ergeben sich für den Stör insgesamt 17 nunmehr bekannte IF-Proteine.

Von drei biochemisch identifizierten I<sub>S</sub>-Keratinen kommt eines nur im Mitteldarm vor und nur einem konnte eine Sequenz zugeordnet werden (K18). Dem einzigen Typ II<sub>S</sub>-Keratin konnte keine Sequenz zugeordnet werden, wahrscheinlich handelt es sich um dabei um das K8-Orthologe. Jedem der fünf Typ I<sub>E</sub>-Proteine konnte eine Sequenz zugeordnet werden (K10 bis K14), ebenso wie dem einzigen identifizierten Typ II<sub>E</sub>-Keratin (K2). Von den Typ III-Proteinen wurden Desmin und Vimentin ihren Proteinflecken zugeordnet. Die nicht zugeordnete Sequenz *abak1* codiert möglicherweise für ein II<sub>E</sub>-Keratin, während *abak15* vermutlich die Sequenz für ein I<sub>E</sub>-Keratin enthält. Bei den Proteinflecken, denen eine Sequenz zugeordnet werden konnten, kann für Abak2 die Zugehörigkeit zum II<sub>E</sub>-Typ angenommen werden, während es sich bei Abak10 wahrscheinlich um ein I<sub>E</sub>-Keratin handelt.

Durch Datenbankvergleiche und molekulare Stammbäume konnte die Zugehörigkeit der identifizierten Lamin-Sequenz zum B<sub>3</sub>-Subtyp der Vertebraten gezeigt werden.

Die Daten der Biochemie und indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie zeigen, daß Keratine in Epithelien und Vimentin in mesenchymalen Geweben vorkommt. Es existieren starke Hinweise, daß im letzten Gewebetyp Keratine auch koexprimiert werden. Desmin kommt in großen Mengen im Magen und im Mitteldarm vor und stellt dort das prominenteste Protein.

Mit den gewonnenen Sequenzdaten wurden molekulare Stammbäume und Sequenzidentitäten berechnet. Die daraus resultierenden Konsequenzen für die Verwandtschaftsverhältnisse der verschiedenen IF-Proteine sowie der Wirbeltiere werden diskutiert.

## F Anhang

### 1. Verwendete Abkürzungen

®	Eingetragenes Warenzeichen
™	Warenzeichen (Trademark)
1D / 2D	Eindimensional / Zweidimensional
A	$\alpha$ -Aktin
Aba	Sibirischer Stör ( <i>Acipenser baeri</i> )
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BNHS	Biotinyl-N-hydroxysuccinimid
cDNA	copy- oder auch complement-DNA
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
Da	Dalton
DEPC	Pyrokohlensäurediethylester (Diethylpyrocarbonat)
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (double strand DNA)
DTT	1,4-Dithiotreitol
dest. H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
„E“	epidermal
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GFAP	Saures Gliafilamentprotein
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Bidestilliertes Wasser
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin, Antikörper
IF	Intermediärfilament
pI	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Galactosid
JTT	Jones-Taylor-Thornton Matrix
kb	Kilobasen (1000 Nukleotide)
kDa	Kilodalton, 10 <sup>3</sup> Dalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M, mM	Molar, Millimolar
MALDI-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie
MCS	Polylinker (multiple cloning site)
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäure Natriumsalz
M <sub>r</sub>	Relative Molekülmasse
mRNA	„Messenger“ Ribonukleinsäure
NBT	p-Nitrobluetetrazoliumchlorid
NF	Neurofilament
nm	Nanometer
Nonidet P40	Nonylphenyl-Polyethylenglykol in destilliertem Wasser
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 Nanometer Wellenlänge
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
pfu	Plauebildende Einheiten (plaque forming units)

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	<i>Reverse Transkriptase</i>
„S“	einfach epithelial (simple epithelial)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelsträngige Desoxribonukleinsäure (single strand DNA)
SSC	Sodium chloride and sodium citrat
Tab.	Tabelle
TBS/TBST	Tris-Buffered-Saline / and Tween
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierter Bereich (untranslated region)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (volume/volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight/volume)

## 2. Kurzbezeichnungen der IF-Proteine und Accession-Nummern

Bezeichnung	Accession-Nummer	Artname	Bezeichnung	Accession-Nummer	Artname
AbaD	AJ493265	<i>Acipenser baeri</i>	CauK18	L09744	<i>Carassius auratus</i>
AbaK1	AJ493262		CauK49	L09743	
AbaK10	AJ493255		CauK50	M86918	
AbaK11	AJ493256		CauK8	M87773	
AbaK12	AJ493257		CauLaB2	AB034198	
AbaK13	AJ493258		CauLaB3	AB034197	
AbaK14	AJ493259		CauV	L23841	
AbaK15	AJ493260		CcaV	S76850	<i>Cyprinus carpio</i>
AbaK18	AJ493261		CellFB2	X78553	<i>Caenorhabditis elegans</i>
AbaK2	AJ493263		CellFA3	X70831	
AbaK8a	AJ493264		CellFC1	X70832	
AbaLaB	AJ493267		CellFC2	X70836	
AbaV	AJ493266		Cella1	X74027	
AbrLa1	AJ132102	<i>Astropecten brasiliensis</i>	CgrV	M16718	<i>Cricetulus griseus</i>
AcalF	X60297	<i>Aplysia californica</i>	CinA2	AJ298329	<i>Ciona intestinalis</i>
BflA1	AJ223574	<i>Branchiostoma floridae</i>	CinB2	AJ298330	
BflA2	AJ223582		CinC2	AJ298331	
BflA3	AJ223575		CinD2	AJ298332	
BflB1	AJ223580		CinF2	AJ298333	
BflC1	AJ223577		CinLa1	AJ271075	
BflC2	AJ245429	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	CinLa2	AJ251957	
BflD1	AJ223581		DmaLaC	AY095046	<i>Drosophila melanogaster</i>
BflIF1	AF108192		DmeLa	X16275	
BlaB1	X64522	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	DreD	U47113	<i>Danio rerio</i>
BlaB2	AJ223576		DreK"8"	--*	
BlaC1	AJ223578		DreK18	AJ493269	
BlaC2	AJ223578		DreK8	AJ460000	
BlaD1	AJ223579		DreKI_AF08446	AF084461	
BlaE1	AJ010294		DreKI_AF19788	AF197880	
BlaE2	AJ010293		DreKII_AF13485	AF134850	
BlaK1	AJ245426		DreKII_AF19790	AF197909	
BlaLa	AJ271077		DreLaA	AF397016	
BlaX1	AJ245427		DreLaB1	AJ250201	
BlaY1	AJ245428		DreLaB2	AJ005936	
BtaD	AB011675	<i>Bos taurus</i>	DreLIII	AF397015	
BtaV	L13263		DreV	AF069994	

EstKa	U11865	<i>Eptatretus stouti</i>	OmyK2	AJ272370	<i>Onchorhynchus mykiss</i>
EstKy	U20546		OmyK3	AJ315933	
GgaD	AB011672	<i>Gallus gallus</i>	OmyK8a	AJ272373	
GgaLaA	X16879		OmyK8b	X92522	
GgaLaB1	X16878		OmyV	Z50738	
GgaLaB2	X16880		PcaLa	AJ005935	<i>Priapulus caudatus</i>
GgaV	M15852		PseD	--	<i>Polypterus senegalus</i>
GpyIF	AJ005004	<i>Glottidia pyramidata</i>	PseK10	--	
HasIF_B	X55947	<i>Helix aspersa</i>	PseK11	--	
HatLa	AJ005934	<i>Hydra attenuata</i>	PseK13	--	
HmelF	AF101063	<i>Hirudo medicinalis</i>	PseK18	--	
HsaD	M63391	<i>Homo sapiens</i>	PseK8	--	
HsaK10	J04029		PseS70	--	
HsaK12	D78367		PseV	--	
HsaK13	X14640		PvalF	AJ004936	<i>Phoronis vancouverensis</i>
HsaK16	AF061812		RcaK8	AB056480	<i>Rana catesbeiana</i>
HsaK17	Z19574		RnoD	X73524	<i>Rattus norvegicus</i>
HsaK18	P05783		RnoK8	M63482	
HsaK19	BC002539		RnoLaA	X76297	
HsaK20	X73501		RnoLaB1	U72353	
HsaK8	BC000654		RnoV	X62952	
HsaK9	X75015		ScIA1	AJ271143	<i>Styela clava</i>
HsaLaA/C	BC000511		ScIB1	AJ271144	
HsaLaB1	M34458		ScIC1	AJ271145	
HsaLaB2	BC006551		ScID1	AJ271146	
HsaLaC	M13451		ScILa	AJ271371	
HsaV	M14144		Self 2	AJ005019	
LfID	AJ308121	<i>Lampetra fluviatilis</i>	SplA1	AJ005020	<i>Styela plicata</i>
LflK1	AJ401159		SplB1	AJ005021	
LflK10	AJ308116		SpuLa	AAB34118	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
LflK11	AJ308117		SstD	Y15064	<i>Scyliorhinus stellaris</i>
LflK18	AJ308118		SstK1	Y17257	
LflK2	AJ308115		SstK18	Y14647	
LflK3	AJ308113		SstK8	Y14648	
LflK8	AJ308114		SstV	AJ243830	
LflKa1	AJ289859		TcaV	X51533	<i>Torpedo californica</i>
LflKa2	AJ308120		Tspc	AJ005937	<i>Tealia spec.</i>
LflKy1	AJ289860		Xla1C1	P08777	
LflKy2	AJ308111		XlaD	X16842	<i>Xenopus laevis</i>
LflKy3	AJ308112		XlaK18	Y00230	
LflNF_L	AJ308119		Xla1C4	P05781	
LflV	AJ278487		XlaK8	M13811	
MauD	K02407	<i>Mesocricetus auratus</i>	XlaLa B2	AF077839	
MauV	K00927		XlaLaA	X06345	
MmuD	L22550	<i>Mus musculus</i>	XlaLaB1	AF077838	
MmuK8	D90360		XlaLI	P09010	
MmuLaA	BC015302		XlaLII	P21910	
MmuLaA	BC015302		XlaLIII	P23420	
MmuLaB1	P14733		XlaV1/2	X16843	
MmuLaB2	X54098		XlaV4	X16844	
MmuLaC	X14170				
MmuV	M24849		<b>Verwendete</b>	<b>IF-Protein</b>	<b>Kurzbezeichnungen</b>
MocC1	AJ417905	<i>Molgula oculata</i>	A1-F2	IF-Proteine der	Tunicaten und Acranier
MocD1	AJ417906		D	Desmin	
NviK8	AJ001296	<i>Notophthalmus viridescens</i>	Ge	Gefiltin	
NviKII	AJ001295		K	Keratin	
OmyD	AJ304373	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	Ka, Ky	Keratinartige	IF-Proteine der Agnathen
OmyK1	AJ272369		La	Lamin	
OmyK10	AJ272372		NF_L_M_H	Neurofilament-	Protein (light, medium, high)
OmyK11	AJ272371		V	Vimentin	
OmyK12	--				
OmyK13	--				<a href="http://www.ebi.ac.uk/embl/">http://www.ebi.ac.uk/embl/</a>
OmyK18	Y14289				
-- Ergebnisse der Arbeitsgruppe - noch nicht in den Datenbanken					
* Sequenz nicht in den Datenbanken; aus (Imboden et al., 1997)					

### 3. Für die PCR von DNA-Sonden verwendete Primer

Bezeichnung	Upstream (US) / Downstream (DS)	Sequenz in 5' - 3' Orientierung
1Fa1_Forward	US	ATA CGA CTT TCC CGC CAA C
1Fa1_Reverse	DS	CAG ACA CCA ACG CTC GCT A
Pse_T3_P1	US	CTG TGA AGA ATA GGT TTA TTG C
Pse_T7_P0	DS	GGC CCC AGT ACG AGC CTA C
OmyK8.1_up1	US	GCA TCT CTC ACG CCC CCA T
OmyK8.1_Do1	DS	CCG TAT CCA CCA CCG TAT C
AbaK8c2_Up1	US	GCA GCC GTT CTT ACA GTT C
AbaK8c2_Up2	US	ATG AGT GTT TCC CGA GTA A
AbaK8c2_Do2	DS	GGT TCT TGG CGT CTG ATA C

### 4. Internetadressen

Methode bzw. Programm	Internet-Adresse
Align	<a href="http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi">http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi</a>
Blast	<a href="http://www.blast.genome.ad.jp">http://www.blast.genome.ad.jp</a>
Chromas	<a href="http://www.technelysium.com.au/chromas.html">http://www.technelysium.com.au/chromas.html</a>
ClustalX	<a href="http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html">http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html</a>
EMBL-Sequenzdatenbank	<a href="http://www.ebi.ac.uk/embl/">http://www.ebi.ac.uk/embl/</a>
FindMod	<a href="http://www.expasy.ch/tools/findmod/">http://www.expasy.ch/tools/findmod/</a>
Genedoc	<a href="http://www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml">http://www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml</a>
Lalign	<a href="http://www2.igh.cnrs.fr/bin/lalign-guess.cgi">http://www2.igh.cnrs.fr/bin/lalign-guess.cgi</a>
Mega	<a href="http://www.megasoftware.net">http://www.megasoftware.net</a>
PeptIdent	<a href="http://www.expasy.ch/tools/peptident.html">http://www.expasy.ch/tools/peptident.html</a>
PeptideMass	<a href="http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html">http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html</a>
Phylip	<a href="http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html">http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html</a>
Translate	<a href="http://www.expasy.ch/tools/dna.html">http://www.expasy.ch/tools/dna.html</a>
Treeview	<a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>
WebCutter	<a href="http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html">http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html</a>
Zoologie, Abt. 2, Uni Mainz	<a href="http://www.uni-mainz.de/FB/Biologie/Zoologie/abt2">http://www.uni-mainz.de/FB/Biologie/Zoologie/abt2</a>

## 5. Übersicht der sequenzierten IF-Proteine

**Tab. 11** Übersicht über die sequenzierten cDNA-Klone und die Bezeichnungen der dazugehörigen IF-Proteine in vorherigen Publikationen. AK, Antikörper, für Details siehe Tab. 1 und Tab. 2; ( \*) die DNA-Sonde wurde aus einer Desmin-Sequenz des Flösselhechts *Polypterus senegalus* erstellt, für Details siehe Ergebnisse C4.2.

Name des Klons im Labor	Neuer Name des Klons ( <i>aba-</i> )	Typ	Flecken in der 2D-PAGE	Detektiert mit	EMBL-Accession-number	Bemerkung
1Eb1	<i>k18</i>	I <sub>S</sub>	D10, D11, D17	AK GPT4	AJ493261	
1Ga1	<i>k10</i>	I <sub>E</sub>	F10; M2	AK GPT4	AJ493255	
1Ha1	<i>k11</i>	I <sub>E</sub>	F6, F7	AK GPT4	AJ493256	
1Hb1	<i>k1</i>	II <sub>E</sub>	--	AK GPT4	AJ493262	im Gel nicht zugeordnet, vermutlich II <sub>E</sub>
2FK1	<i>k12</i>	I <sub>E</sub>	F8	AK GPT4	AJ493257	
5a4	<i>k13</i>	I <sub>E</sub>	F9, F11	AK GPT 5	AJ493258	unvollständiger Klon
5d2	<i>k14</i>	I <sub>E</sub>	F12	AK GPT 5	AJ493259	
8c2	<i>k8a</i>	II <sub>S</sub>	--	AK IFA	AJ493264	Stop-Codon vor K8-Motiv, im Gel nicht zugeordnet
15c2	<i>k15</i>	I <sub>E</sub>	--	AK GPT 5	AJ493260	im Gel nicht zugeordnet
15d4	<i>k2</i>	II <sub>E</sub>	F1-5; D1, D2	AK GPT 5	AJ493263	unvollständiger Klon
3B5	<i>Vim</i>	VIM	K1	AK DES	AJ493266	
9B4	<i>Des</i>	DES	M1; D5-7; C1-5	DNA-Sonde*	AJ493265	
12C5	<i>LaB</i>	La-B	--	AK IFA	AJ493267	Langer 3'-UTR, im Gel nicht zugeordnet

## 6. Tabellen der MALDI-MS Daten

Vergleich der MALDI-MS-Daten der analysierten Proteinflecken mit dem Spektrum einer theoretisch tryptisch verdauten IF-Proteinsequenz. Oxidierte Methionine beziehungsweise deren theoretische Masse sind **Rot** dargestellt (MSO, Masse + ~16). Fragmente mit einer, zwei oder drei übersprungenen tryptischen Schnittstellen sind entweder **blau**, **dunkelrot** oder **grün** dargestellt. Die Proteinfleck-(Spot) Nr. bezieht sich auf das Gewebe, aus dem das Protein isoliert wurde: Seitenflosse (F), Mitteldarm (D), Magen (M), Körperwand (K) und eine Koelektrophorese (C) von Seitenflosse und Mitteldarm. In einigen Fällen konnten einer gemessenen Masse zwei theoretische Fragmente zugewiesen werden. Die Nummer der Fragmente wurden zusätzlich mit einem Buchstaben (a, b) versehen und die entsprechenden Massen mit **orange** hervorgehoben.

## 6.1 Typ I-Keratine

- AbaK10, Proteinflecken F10 und M2

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Praktische Masse	Spot
1	023-033	<ALSVYGGAGGR>	1007,52	1007,55 1007,46	F10 M2
2	120-128	<ATMQLNDR>	1062,50 MSO → 1078,50	1078,50 1078,49	F10 M2
3	136-145	<VRSLEAANSK>	1074,59	1074,57 1074,51	F10 M2
4	138-151	<SLEAANSKLELQIR>	1571,87	1571,75	F10
5	146-151	<LELQIR>	771,47	771,54 771,47	F10 M2
6	152-163	<QFYENSSPIVQR>	1467,72	1467,63 1467,68	F10 M2
7	164-170	<DYSAYWK>	932,41	932,47 932,46	F10 M2
8	189-197	<ILLQIDNAK>	1027,61	1027,64 1027,63	F10 M2
9	198-214	<LAADDFGTYEHELMMR>	2026,93 MSO → 2058,92	2058,68 2058,93	F10 M2
10	207-214	<YEHELMMR>	1108,49 MSO → 1140,48	1140,47 1140,41	F10 M2
11	215-225	<QSVENDIANLR>	1258,63	1258,59 1258,60	F10 M2
12	215-226	<QSVENDIANLRR>	1414,74	1414,63 1414,65	F10 M2
13	226-253	<RLLDQTTLTKADLEMQIEGLNDELAYLK>	3234,69 MSO → 3250,68	3250,93	F10
14	227-235	<LLDQTTLTK>	1032,59	1032,58	F10
15	236-253	<ADLEMQIEGLNDELAYLK>	2065,01 MSO → 2081,01	2080,75 2081,01	F10 M2
16	254-264	<KNHQEELLALR>	1350,74	1350,69 1350,64	F10 M2
17	255-264	<NHQEELLALR>	1222,65	1222,61 1222,56	F10 M2
18	265-285	<SQVGGTVNVEVDAAPQQDTS R>	2158,03	2157,76 2158,06	F10 M2
19	286-291	<VLEEMR>	776,39 MSO → 792,39	792,46 792,42	F10 M2
20	286-302	<VLEEMRMQYEGIADKNR>	2082,01 MSO → 2114,00	2113,76 2114,08	F10 M2

21	292-300	<MQYEGIADK>	1054,48 MSO → 1070,48	1070,43 1070,45	F10 M2
22	304-310	<DVEAWYK>	910,43	910,49 910,47	F10 M2
23	311-331	<DKFESLNQQVTSSTQAIETH R>	2419,18	2418,83 2419,14	F10 M2
24	313-331	<FESLNQQVTSSTQAIETHR>	2176,06	2175,78 2176,06	F10 M2
25	332-339	<SEINDLRR>	1002,53	1002,55 1002,49	F10 M2
26	340-355	<TIQGLEIELQSALSMK>	1760,94 MSO → 1776,94	1776,77 1776,96	F10 M2
27	356-368	<QAMENTLAETEAR>	1463,67 MSO → 1479,67	1479,62 1479,63	F10 M2
28	369-391	<YSNMLQGYQNNINMLEAELN QVR>	2742,29 2x MSO → 2774,28	2773,84	F10
29	414-419	<EIATYR>	752,39	752,46	F10
30	420-434	<QLLDVEDSRIPTGGK>	1627,86	1627,68 1627,80	F10 M2
31	429-451	<IPTGGKDQFITTTTTTTNLP RPK>	2488,34	2487,97 2488,28	F10 M2
32	435-451	<DQFITTTTTTTNLP RPK>	1935,01	1934,80 1935,02	F10 M2

• **AbaK11, Proteinflecken F6 und F7**

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Praktische Masse	Spots
1	033-043	<ALSVYGGAGGR>	1007,52	1007,53 1007,53	F6 F7
2	033-046	<ALSVYGGAGGRGSR>	1307,681	1307,17	F6
3	128-136	<ATMQNLNDR>	1062,50 MSO → 1078,49	1078,44 1078,46	F6 F7
4	128-145	<ATMQNLNDR LASYLEKVR>	2122,10 MSO → 2138,10	2122,11	F7
5	146-159	<SLEAANSKLELQIR>	1571,87	1571,83 1571,83	F6 F7
6	154-159	<LELQIR>	771,47	771,46 771,46	F6 F7
7	160-171	<QYYEHSHPVVQR>	1542,74	1542,72 1542,72	F6 F7
8	172-178	<DYSAYWK>	932,41	932,39 932,39	F6 F7

9	190-196	<ATVDNSR>	762,37	762,36 762,35	F6 F7
10	197-205	<ILLQIDNAK>	1027,61	1027,57 1027,59	F6 F7
11	206-222	<LAADDFVTKYEQELMMR>	2059,98 MSO → 2091,97	2091,99 2092,00	F6 F7
12	223-233	<QSVENDIANLR>	1258,63	1258,64	F7
13	223-234	<QSVENDIANLRR>	1414,74	1414,69 1414,70	F6 F7
14	235-243	<LLEHTNLTK>	1068,60	1068,54 1068,55	F6 F7
15	244-254	<ADLEMQIGNLR>	1259,64 MSO → 1275,63	1275,57 1275,60	F6 F7
16	244-261	<ADLEMQIGNLRDELAYLK>	2092,07 MSO → 2108,06	2108,08 2108,03	F6 F7
17	244-262	<ADLEMQIGNLRDELAYLKK>	2220,16 MSO → 2236,16	2236,20	F6
18	262-269	<KNHEEEMR>	1072,48 MSO → 1088,47	1088,47	F6
19	263-269	<NHEEEMR>	944,38 MSO → 960,38	960,39	F6
20	273-293	<SQVGGTVNVEVDAAPQQDTS R>	2158,03	2158,09 2158,10	F6 F7
21	294-299	<VLEEMR>	776,39 MSO → 792,39	792,36 792,36	F6 F7
22	312-318	<EVEAWYK>	924,44	924,41 924,42	F6 F7
23	312-320	<EVEAWYKDK>	1167,56	1167,56 1167,55	F6 F7
24	312-339	<EVEAWYKDKFDMLSHQVTTSTQAIETSR>	3300,58 MSO → 3316,57	3316,66	F7
25	319-339	<DKFDMLSHQVTTSTQAIETSR>	2395,15 MSO → 2411,15	2411,19 2411,19	F6 F7
26	340-346	<TQINDLR>	859,46	859,46 859,46	F6 F7
27	340-347	<TQINDLRR>	1015,56	1015,54 1015,54	F6 F7
28	348-363	<TVQGLEIELQSVLSMR>	1802,96 MSO → 1818,963	1818,95 1818,96	F6 F7
29	364-376	<QALENTLAETEAR>	1445,72	1445,67 1445,70	F6 F7
30	411-416	<LLLDIK>	714,47	714,41	F6
31	417-421	<TRLEK>	646,38	646,35	F6

32	422-427	<EIATYR>	752,39	752,38 752,37	F6 F7
33	428-442	<QLLDVEAAQIPTGVK>	1581,88	1581,79 1581,83	F6 F7
34	428-450	<QLLDVEAAQIPTGVKDQYITTTK>	2532,35	2532,39 2532,38	F6 F7
35	451-456	<SYVQVK>	723,40	723,36	F6

- AbaK12, Proteinfleck F8

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Praktische Masse	Spots
1	019-043	<ISSGSGAYGSSSFSLSGGGMSGGQK>	2253,01 MSO → 2269,00	2269,05	F8
2	044-057	<AMSMYGGSSNVHSR>	1483,64 2x MSO → 1515,63	1515,56	F8
3	089-097	<QTMINLNDR>	1104,55 MSO → 1120,54	1120,50	F8
4	121-126	<EWSQNR>	819,37	819,40	F8
5	127-144	<SVVSSDYSAYNATIDDLR>	1975,92	1976,01	F8
6	147-165	<IAAALNVNSGIIHIDNAK>	1947,10	1947,15	F8
7	166-172	<LAADDFR>	807,40	807,42	F8
8	173-182	<VKYENELTMR>	1282,65	1298,70	F8
9	175-182	<YENELTMR>	1055,48 MSO → 1071,48	1071,45	F8
10	195-203	<LLEDELTLR>	1059,60	1059,64	F8
11	204-221	<SDLEMQLLEGLKEELIYLK>	2151,13 MSO → 2167,12	2167,14	F8
12	204-222	<SDLEMQLLEGLKEELIYLKK>	2279,22 MSO → 2295,215	2295,26	F8
13	223-232	<NHEEELASCR>	1187,51	1187,73	F8
14	233-253	<SQLSGQVQVEVDAAPGVDLA K>	2111,10	2111,45	F8
15a	254-259	<IIAEIR>	714,45	714,44	F8
16	271-280	<RDVEAWYQGK>	1251,61	1251,61	F8
17	272-280	<DVEAWYQGK>	1095,51	1095,46	F8
18	281-299	<VEVVQQQVTEHTESLQSSK>	2156,08	2156,14	F8
19	300-307	<TEIKDLNR>	988,54	988,56	F8
20	308-323	<TLQGLQIELQSLHTMK>	1840,00 MSO → 1856,00	1855,98	F8
21	324-336	<QSLEANLADTNAR>	1402,69	1402,68	F8

22	337-359	<YSAQLSHLQSVVTSLEAQLTQLR>	2572,37	2572,46	F8
23	360-370	<ADTEHSAEEYR>	1307,55	1307,55	F8
15b	371-376	<ILLDIK>	714,48	714,44	F8
24	377-387	<TRLELEIAEYR>	1392,75	1392,74	F8
25	377-388	<TRLELEIAEYRR>	1548,85	1548,84	F8
26	379-387	<LELEIAEYR>	1135,60	1135,64	F8
27	379-388	<LELEIAEYRR>	1291,70	1291,69	F8

• AbaK13, Proteinflecken F9 und F11

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Praktische Masse	Spot
1	054-062	ATMINLNR	1047,53 MSO → 1063,52	1063,51 1063,50	F9 F11
2	063-069	LAIYLEK	849,51	849,48 849,48	F9 F11
3	086-091	EWSQNR	819,37	819,37 819,38	F9 F11
4	092-103	AVITHDYSAYWK	1453,71	1453,66 1453,64	F9 F11
5	104-109	TIADLR	688,40	688,37 688,38	F9 F11
6	122-130	IILQIDNAK	1027,61	1027,59 1027,60	F9 F11
7	131-137	LAADDFR	807,40	807,40 807,40	F9 F11
8	138-147	VKYENELAMR	1252,64 MSO → 1268,63	1268,59 1268,58	F9 F11
9	148-158	QSVEADIAGLR	1158,61	1158,61 1158,58	F9 F11
10	148-159	QSVEADIAGLRR	1314,71	1314,67 1314,66	F9 F11
11	160-168	LLDELTAR	1043,61	1043,60 1043,62	F9 F11
12	169-179	SSLEMEIEGLK	1235,62 MSO → 1251,61	1235,61	F9
13	169-186	SSLEMEIEGLKEELIYLK	2124,11 MSO → 2140,11	2140,13 2140,17	F11 F9
14	169-187	SSLEMEIEGLKEELIYLKK	2252,21 MSO → 2268,20	2268,23	F9
15	187-197	KNHEEELLALR	1351,73	1351,60 1351,69	F9 F11
16	188-197	NHEEELLALR	1223,64	1223,60 1223,61	F9 F11
17	219-224	VLDEM <sup>R</sup>	762,38 MSO → 778,38	778,36 778,36	F9 F11
18	219-236	VLDEM <sup>R</sup> RAQYEGIAEK <sup>NR</sup>	2178,11 MSO → 2194,10	2178,09	F11
19	225-233	AQYEGIAEK	1008,50	1008,49	F11

20	237-243	DVEAWYK	910,43	910,44 910,42	F9 F11
21	237-251	DVEAWYKDKFDDLNK	1885,90	1885,91 1885,94	F9 F11
22	265-271	SEISELR	833,44	833,44 833,42	F9 F11
23	265-272	SEISELRR	989,54	989,52 989,53	F9 F11
24	272-288	RTLQGLEIELQSLSMK	1974,07 MSO → 1990,06	1990,14	F11
25	273-288	TLQGLEIELQSLSMK	1817,97 MSO → 1833,96	1833,94 1833,96	F9 F11
26	289-301	SALEGLAETEGR	1333,66	1333,65 1333,60	F9 F11
27	302-315	YGAKLSHLQTIIDR	1614,90	1614,71 1614,72	F9 F11
28	306-315	LSHLQTIIDR	1195,68	1195,64 1195,66	F9 F11
29	316-324	LQTELMQVR	1117,60 MSO → 1133,60	1133,56 1133,56	F9 F11
30	325-343	MDMERQGNEYKMLLDIKTR	2371,16 3x MSO → 2419,14	2419,23 2419,24	F9 F11
31	330-341	QGNEYKMLLDIK	1451,76 MSO → 1467,75	1467,69	F9
32	336-341	MLLDIK	732,43 MSO → 748,43	748,38	F11
33	336-352	MLLDIKTRLEMEIAEYR	2124,12 2x MSO → 2156,11	2156,11 2156,09	F9 F11
34	342-352	TRLEMEIAEYR	1410,70 MSO → 1426,70	1426,64 1426,63	F9 F11
35	342-353	TRLEMEIAEYRR	1566,81 MSO → 1582,80	1582,75 1582,75	F9 F11
36	344-352	LEMEIAEYR	1153,56 MSO → 1169,55	1169,53 1169,52	F9 F11
37	344-353	LEMEIAEYRR	1309,66 MSO → 1325,65	1325,60 1325,60	F9 F11
38	354-371	LLDGEDSGKGYNSQSSQK	1912,89	1912,90 1912,93	F9 F11
39	395-409	TMIVEEVDGVVNTR	1660,86 MSO → 1676,85	1676,84 1676,82	F9 F11
40	395-417	TMIVEEVDGVVNTREEMVEEPM	2635,23 MSO → 2683,21	2683,26	F9

- AbaK14, Proteinfleck F12

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Praktische Masse	Spot
1	009-023	<FSSAS <b>M</b> GGGGGGGSIR>	1327,61 MSO → <b>1343,60</b>	1343,57	F12
2	009-024	<FSSAS <b>M</b> GGGGGGGS <b>I</b> RR>	<b>1483,71</b> MSO → <b>1499,70</b>	1499,66	F12
3	135-151	<VESHDYSAYEAQLKPIR>	2006,00	2006,04	F12
4	135-163	<VESHDYSAYEAQLKPIRDQIINIILENAR>	<b>3398,77</b>	3398,73	F12
5	152-163	<DQIINIILENAR>	1411,79	1411,77	F12
6	173-179	<LAADDFR>	807,40	807,40	F12
7	180-189	<MKFEAEYAIR>	<b>1257,63</b>	1257,62	F12
8	180-189	< <b>M</b> KFEAEYAIR>	<b>1257,63</b> MSO → <b>1273,62</b>	1273,59	F12
9	182-189	<FEAEYAIR>	998,49	998,51	F12
10	190-204	<QSVEADINGLGGLKK>	<b>1528,83</b>	1528,80	F12
11	205-211	<EYEFNHK>	966,43	966,43	F12
12	212-228	<TLLQDIEGLKDELDFLK>	<b>1990,07</b>	1990,11	F12
13	212-229	<TLLQDIEGLKDELDFL <b>K</b> K>	<b>2118,17</b>	2118,21	F12
14	230-239	<NHEEELASLR>	1197,59	1197,56	F12
15	240-260	<SE <b>M</b> SGTVSVDLQAAPAVDLQR>	2174,08 MSO → <b>2190,07</b>	2190,11	F12
16	261-266	<VLDDIR>	730,41	730,41	F12
17	261-274	<VLDDIRAEYEGVAR>	<b>1605,82</b>	1605,80	F12
18	267-274	<AEYEGVAR>	894,43	894,45	F12
19	275-282	<RSQEEAER>	<b>1004,48</b>	1004,48	F12
20	276-282	<SQEEAER>	848,37	848,39	F12
21	307-314	<TEFTDLRR>	<b>1037,54</b>	1037,54	F12
22	314-330	<RQYQNLQAELDALNASK>	<b>1962,00</b>	1962,05	F12
23	315-330	<QYQNLQAELDALNASK>	1805,90	1805,89	F12
24	331-343	<SSLEQV <b>L</b> MDTEGR>	1464,70 MSO → <b>1480,70</b>	1480,66	F12

25	344-357	<YQ <b>M</b> QLQQISAIVGR>	1634,87 MSO → <b>1650,86</b>	1650,83	F12
26	358-366	<LQ <b>Q</b> EL <b>M</b> NVR>	1130,60 MSO → <b>1146,59</b>	1146,57	F12
27	367-383	<DS <b>M</b> TAQSQEYQ <b>N</b> LLNIK>	1982,95 MSO → <b>1998,94</b>	1998,96	F12
28	395-424	<KL <b>L</b> EGAEPGAV <b>M</b> LGGGGAGVNTSQT <b>V</b> IT <b>K</b> >	<b>2854,53</b> MSO → <b>2870,53</b>	2870,52	F12
29	396-424	<L <b>L</b> EGAEPGAV <b>M</b> LGGGGAGVNTSQT <b>V</b> IT <b>K</b> >	2726,44 MSO → <b>2742,43</b>	2742,43	F12

• AbaK18, Proteinflecken D10, D11 und D17

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Praktische Masse	Spots
1a	021-029	<SSQ <b>V</b> MTVQR>	1035,52	<b>1035,59</b> <b>1035,56</b>	D11 D17
2	021-029	<SSQ <b>V</b> MTVQR>	1035,52 MSO → <b>1051,52</b>	1051,50	D10
3	030-046	<S <b>M</b> PLASAASVYGGAGGR>	1551,75 MSO → <b>1567,75</b>	1567,70 1567,68	D10 D11
4	050-086	<ISVGGSSSGFGSGLGSGAGGSYSSMSV SGSGLVGNEK>	3267,50	3267,55	D10
5	050-086	<ISVGGSSSGFGSGLGSGAGGSYSSMSV SGSGLVGNEK>	3267,50 MSO → <b>3283,50</b>	3283,49 3283,58 3283,54	D10 D11 D17
6	087-095	<ET <b>M</b> I <b>L</b> GNDR>	1048,50 MSO → <b>1064,50</b>	1064,50 1064,50	D10 D17
7	087-112	<ET <b>M</b> I <b>L</b> GNDR <b>L</b> AAYLETVR <b>N</b> LEQANS <b>K</b> >	<b>2949,51</b> MSO → <b>2965,50</b>	2949,52	D10
1b	096-104	<L <b>A</b> AYLETVR>	1035,58	<b>1035,58</b> <b>1035,56</b>	D10 D17
8	105-118	< <b>N</b> LEQANS <b>K</b> LEFQIR>	<b>1689,89</b>	1689,88 1689,87	D10 D11
9	113-118	<LEFQIR>	805,45	805,45 805,48 805,56	D10 D11 D17
10	124-129	< <b>K</b> GP <b>T</b> TR>	<b>659,38</b>	659,36	D10
11	125-142	<G <b>P</b> TT <b>R</b> DLSP <b>F</b> E <b>K</b> T <b>L</b> ED <b>L</b> R>	<b>2075,07</b>	2075,29	D10
12	130-136	<DLSP <b>F</b> E <b>K</b> >	835,42	835,41	D10
13	130-143	<DLSP <b>F</b> E <b>K</b> T <b>L</b> ED <b>L</b> R <b>K</b> >	<b>1690,92</b>	1690,90	D17
14	137-142	<T <b>L</b> ED <b>L</b> R>	746,40	746,39 746,37	D10 D11
15	145-154	<V <b>Y</b> DM <b>T</b> MDNSR>	1231,50	1231,52	D10
16	145-154	<V <b>Y</b> DM <b>T</b> MDNSR>	1231,50 2x MSO → <b>1263,49</b>	1263,45 1263,42 1263,52	D10 D11 D17

17	155-163	<LVLQIDNSR>	1057,60	1057,60 1057,60 1057,58	D10 D11 D17
18	171-180	<VKFESEYSIR>	1257,64	1257,63 1257,61 1257,67	D10 D11 D17
19	173-180	<FESEYSIR>	1030,48	1030,48 1030,48 1030,48	D10 D11 D17
20	181-191	<QSVESDIIGLR>	1216,65	1216,64 1216,64 1216,66	D10 D11 D17
21	181-192	<QSVESDIIGLRK>	1344,74	1344,72 1344,72	D10 D11
22	192-201	<KVIDDTNMGR>	1148,57 MSO → 1164,56	1164,53	D10
23	220-230	<QNHNQEVNDLR>	1366,64	1366,61 1366,61 1366,69	D10 D11 D17
24	231-246	<NQIAQSGVQVDVDAPK>	1668,86	1668,88	D17
25	247-258	<GQDLAQVLAEVR>	1298,70	1298,69 1298,69 1298,74	D10 D11 D17
26	259-267	<AQYESMAQK>	1055,48 MSO → 1071,47	1071,45	D10
27	259-273	<AQYESMAQKNRDELK>	1810,87 MSO → 1826,87	1827,20 1827,11	D10 D11
28	268-273	<NRDELK>	774,41	774,393	D10
29	274-298	<AWHENKLTEVEVEVIQNTEA LQGAR>	2864,45	2864,45 2864,49	D10 D11
30	280-298	<LTEVEVEVIQNTEALQGAR>	2099,09	2099,14 2099,14 2099,16	D10 D11 D17
31	299-306	<TEVTELRR>	1003,55	1003,55 1003,55	D10 D11
32	306-319	<RQMQSLEIELESQR>	1746,88 MSO → 1762,87	1762,84 1762,87 1762,91	D10 D11 D17
33	307-319	<QMQSLEIELESQR>	1590,77	1590,74 1590,74 1590,82	D10 D11 D17
34	307-319	<QMQSLEIELESQR>	1590,77 MSO → 1606,77	1606,72 1606,72 1606,80	D10 D11 D17
35	320-335	<SMKASLEDSL RDTEMR>	1868,65	1868,88	D17
36	323-330	<ASLEDSL R>	890,45	890,45 890,47	D10 D11
37	323-335	<ASLEDSL RDTEMR>	1522,71 MSO → 1538,71	1538,66	D10
38	323-342	<ASLEDSL RDTEMRNNMEMER>	2427,07 3x MSO → 2475,05	2475,06	D10
39	336-342	<NNMEMER>	923,37 2x MSO → 955,36	955,35	D10
40	343-358	<YNNMILQLEAELGQLR>	1904,99 MSO → 1920,98	1920,99 1920,98 1921,01	D10 D11 D17

41	359-375	<GNIQM <b>Q</b> ASEYEALLNIK>	1921,96 MSO → <b>1937,96</b>	1937,96 1937,97 1937,99	D10 D11 D17
42	359-377	<GNIQM <b>Q</b> ASEYEALLNIK <b>MK</b> >	<b>2181,10</b> 2x MSO → <b>2213,09</b>	2181,15 2181,16 2181,17	D10 D11 D17
43	376-386	< <b>M</b> KLEAEIATYR>	<b>1324,69</b> MSO → <b>1340,68</b>	1340,64 1340,63 1340,70	D10 D11 D17
44	376-387	< <b>M</b> KLEAEIATYRR>	<b>1480,79</b> MSO → <b>1496,78</b>	1496,73	D10
45	387-395	<RLLDGEDFR>	<b>1120,57</b>	1120,54 1120,54	D10 D11
46	388-395	<LLDGEDFR>	964,47	964,48 964,48 964,45	D10 D11 D17
47	412-422	<VTVTQTLVDGK>	1160,65	1160,60	D10
48	423-435	< <b>V</b> VSESTNTKEIGK>	<b>1391,73</b>	1391,56	D10

## 6.2 Typ II-Keratine

- AbaK2, Proteinflecken F1, F2, F3, F4, F5, D1 und D2

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Praktische Masse	Spots
1	081-089	EQIKGLNNR	1071,59	1071,55 1071,56 1071,53 1071,56 1071,56 1071,54 1071,58	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
2	090-096	FASFIDK	827,43	827,40 827,39	F1 F5
3	090-098	FASFIDKVR	1082,60	1082,59 1082,60 1082,58 1082,52 1082,55 1082,59 1082,58	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
4	099-105	FLEQQNK	906,47	906,44 906,47 906,44 906,47 906,44 906,44 906,48	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
5	122-136	SNINAMFEAYIANLR	1726,86	1726,87	D1
6	122-136	SNINAM <b>F</b> EAYIANLR	1726,86 MSO → <b>1742,85</b>	1742,86 1742,86 1742,83 1742,86 1742,86 1742,83 1742,85	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2

7	122-137	SNINAMFEAYIANLRR	1882,96 MSO → 1898,95	1898,99 1898,97 1898,95 1898,98 1898,98 1898,96 1898,95	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
8	138-146	QLDSLGN DK	989,49	989,48 989,49 989,50 989,50 989,47 989,52	F1 F2 F4 F5 D1 D2
9a	138-148	QLDSLGN DKMK	1248,63	1248,66 1248,66 1248,61 1248,65 1248,64 1248,62 1248,68	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
10	149-164	LES DLSNM QNMVEDFK	1899,85 MSO → 1931,84	1931,86 1931,87 1931,88 1931,87 1931,85 1931,86	F1 F2 F4 F5 D1 D2
11	149-174	LES DLSNM QNMVEDFKNKYE DEINKR	3189,48 MSO → 3221,47	3221,50 3221,54	F4 D2
12	165-174	NKYEDEINKR	1308,65	1308,64 1308,63 1308,62 1308,65 1308,60 1308,64 1308,61	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
13	167-174	YEDEINKR	1066,52	1066,51 1066,53 1066,50 1066,53 1066,48 1066,52 1066,51	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
9b	175-185	ASVENEFVLLK	1248,68	1248,66 1248,66 1248,61 1248,65 1248,64 1248,62 1248,68	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
14	186-195	KDVDGAYMNK	1140,54 MSO → 1156,53	1156,62 1156,62	F4 F5
15	187-201	DVDGAYMNKVELEAK	1681,81 MSO → 1697,81	1697,80 1697,80 1697,74 1697,81 1697,79 1697,76 1697,78	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
16	187-213	DVDGAYMNKVELEAKVDALQ DEINFLR	3095,54 MSO → 3111,53	3111,58	F1

17	202-213	VDALQDEINFLR	1432,74	1432,73 1432,72 1432,72 1432,72 1432,71 1432,71 1432,72	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
18	214-221	AIYEEELR	1022,52	1022,51 1022,53 1022,52 1022,54 1022,51 1022,52 1022,52	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
19	214-228	AIYEEELREMQSIK	1866,93 MSO → 1882,92	1882,96 1882,95 1882,92 1882,96 1882,95 1882,93 1882,96	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
20	214-240	AIYEEELREMQSIKDTSVLEMDNSR	3213,54 MSO → 3245,53	3245,55	F1
21	222-228	EMQSIK	863,43 MSO → 879,42	879,41	F1
22	222-240	EMQSIKDTSVLEMDNSR	2210,04 MSO → 2242,03	2242,08 2242,07 2242,08 2242,07 2242,06 2242,06	F1 F2 F4 F5 D1 D2
23	241-252	NLDMDSIVAEVR	1361,67 MSO → 1377,67	1377,66 1377,66 1377,63 1377,67 1377,65 1377,64 1377,68	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
24	253-261	AQYEDIAAK	1008,50	1008,47 1008,48 1008,45 1008,47 1008,48	F1 F2 F3 F5 D2
25	262-271	SRAEAESWYK	1226,58	1226,56 1226,57 1226,55 1226,56 1226,53 1226,56 1226,55	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
26	264-271	AEAESWYK	983,45	983,43 983,46 983,42 983,44 983,44 983,43 983,46	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
27	272-289	QKYEEMSTSAGQYGDDL	2077,91 MSO → 2093,91	2093,97 2093,95 2093,90 2093,95 2093,94 2093,95 2093,92	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2

28	274-289	YEE <b>M</b> STSAGQYGDDL <b>R</b>	1821,76 MSO → <b>1837,75</b>	1837,78 1837,78 1837,76 1837,77 1837,78 1837,76 1837,74	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
29	293-300	SEIAELNR	931,48	931,48 931,49 931,49 931,49 931,50 931,50 931,50	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
30	305-313	LTSEIESVK	1005,55	1005,51 1005,56 1005,52 1005,55 1005,53	F1 F2 F3 F5 D2
31	317-329	GNLEAQIAEAEER	1429,69	1429,79 1429,67 1429,68 1429,70 1429,66 1429,68 1429,68	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
32	317-335	GNLEAQIAEAEERGELAVK	2027,04	2027,11 2027,08 2027,08 2027,08 2027,11 2027,10 2027,04	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
33	351-357	AKQDMAR	819,41	819,42 819,44 819,40 819,43 819,41 819,42 819,41	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
34	351-357	AKQDMAR	819,41 MSO → <b>835,41</b>	835,40 835,36 835,37 835,36	F1 F3 D1 D2
35	351-360	AKQDMARQVR	1202,64	1202,54 1202,55	F1 F3
36	361-369	EYQEL <b>M</b> NV <b>K</b>	1153,56 MSO → <b>1169,55</b>	1169,50 1169,20 1169,51 1169,62 1169,54 1169,50 1169,54	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
37	370-380	LALDIEIATYR	1277,71	1277,69 1277,70 1277,69 1277,69 1277,68 1277,70 1277,70	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
38	370-381	LALDIEIATYRK	1405,80	1405,78 1405,78 1405,76 1405,79 1405,77 1405,78 1405,77	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2

39	381-389	KLLEGEESR	1060,56	1060,56 1060,56 1060,56 1060,54 1060,56 1060,56 1060,56	F1 F2 F3 F4 F5 D1 D2
40	474-486	VSYSQSSTTKTKR	1472,77	1472,76 1472,73 1472,68 1472,65	F1 F2 F4 F5

### 6.3 Typ III-Proteine Desmin und Vimentin

- Desmin, Proteinflecken D5, D6, D7, M1 und C1 bis C5\*

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Praktische Masse	Spot
1	016-030	<RTFGGGAAASPQFSR>	1509,76	1509,71 1509,73 1509,72 1509,76	M1 D5 D6 D7
2	017-030	<TFGGGAAASPQFSR>	1353,66	1353,63 1353,66	M1 D7
3	031-036	<ASYSSR>	670,32	670,28 670,30	D5 D6
4	047-052	<VYQVSK>	723,40	723,37	D6
5	053-063	<SSASPSFSSYR>	1175,53	1175,54 1175,54 1175,53 1175,54	M1 D5 D6 D7
6	072-094	<VYGGETLDFSLADAMNQEFLQTR>	2605,22	2605,40 2605,35	D5 D6
7	072-094	<VYGGETLDFSLADAMNQEFLQTR>	2605,22 MSO → 2621,22	2621,33 2621,35 2621,31 2621,37	M1 D5 D6 D7
8	099-107	<AELQHLNDR>	1095,55	1095,57 1095,57 1095,54 1095,57	M1 D5 D6 D7
9	099-114	<AELQHLNDRFVNYIEK>	1989,02	1989,19	D7
10	108-114	<FVNYIEK>	912,48	912,47 912,47 912,49 912,46	M1 D5 D6 D7
11	117-131	<FLEQQNQTLVVEIER>	1845,97	1846,02 1846,02 1846,02 1846,07	M1 D5 D6 D7
12	132-139	<LKGREPTR>	956,56	956,53 956,57 956,58	M1 D5 D7

13	134-139	<GREPTR>	715,39	715,37 715,34 715,34 715,35	M1 D5 D6 D7
14	140-149	<VAEIYEEEMR>	1268,58	1268,59 1268,59 1268,60	D5 D6 D7
15	140-149	<VAEIYEEEMR>	1268,58 MSO → 1284,58	1284,55 1284,55 1284,55 1284,53	M1 D5 D6 D7
16	153-162	<RQVDILTNR>	1242,69	1242,74 1242,74 1242,75	M1 D6 D7
17	154-162	<QVDILTNR>	1086,59	1086,61 1086,57 1086,59 1086,59	M1 D5 D6 D7
18	163-178	<GRVEVERDNLADDLQK>	1856,95	1857,00 1856,98 1857,03	D5 D6 D7
19	165-178	<VEVERDNLADDLQK>	1643,82	1643,84 1643,87	M1 D5
20	191-201	<EDAENNLAAFR>	1249,58	1249,59 1249,58 1249,58 1249,58	M1 D5 D6 D7
21	202-211	<ADVDAATLAR>	1002,52	1002,54 1002,49 1002,52 1002,51	M1 D5 D6 D7
22	217-229	<RIESLQEEIAFLR>	1603,88	1603,87 1603,87 1603,86 1603,92	M1 D5 D6 D7
23	217-230	<RIESLQEEIAFLRK>	1731,98	1731,97 1731,98 1731,99 1732,04	M1 D5 D6 D7
24	218-229	<IESLQEEIAFLR>	1447,78	1447,77 1447,78 1447,77 1447,78	M1 D5 D6 D7
25	268-276	<SQYENIAAK>	1023,51	1023,49	D5
26	277-286	<NIQEAEWYK>	1309,61	1309,57	M1
27	299-304	<NNDALR>	702,35	702,32 702,34 702,34	D5 D6 D7
28	329-336	<GTNDSLMR>	893,42 MSO → 909,41	909,40 909,42	D5 D6
29	340-344	<EMEER>	693,29 MSO → 709,28	709,24 709,28 709,25	D5 D6 D7

30	345-358	<FSGEASGYQDNISR>	1530,68	1530,67 1530,68 1530,66 1530,70	M1 D5 D6 D7
31	359-367	<LEAEIANMK>	1018,52	1018,39 1018,37 1018,39 1018,39	M1 D5 D6 D7
32	359-372	<LEAEIANMKDEMAR>	1620,77 MSO → 1652,76	1652,73 1652,75 1652,72	M1 D5 D6
33	376-384	<EYQDLLNVK>	1121,58	1121,57 1121,55 1121,58 1121,53	M1 D5 D6 D7
34	385-395	<MALDVEIATYR>	1281,65 MSO → 1297,65	1297,59 1297,62 1297,61	M1 D5 D6
35	385-396	<MALDVEIATYRK>	1409,75 MSO → 1425,74	1425,68 1425,71	M1 D5
36	396-418	<KLEGEENRVSLPIQSFSSLSFR>	2636,40	2636,50	D7
37	397-404	<LLEGEENR>	959,48	959,52 959,49 959,49 959,50	M1 D5 D6 D7
38	397-418	<LLEGEENRVSLPIQSFSSLSFR>	2508,31	2508,37	D6
39	405-418	<VSLPIQSFSSLSFR>	1567,85	1567,83 1567,84 1567,83	M1 D5 D6
40	419-427	<ETSPGQHQR>	1039,49	1039,49 1039,51 1039,48 1039,50	M1 D5 D6 D7
41	441-461	<TIETRDGEVVSESTQQQHDSI>	2359,10	2359,25 2359,22	D5 D6
42	446-461	<DGEVVSESTQQQHDSI>	1758,78	1758,80 1758,80 1758,80	M1 D5 D6

\* auf die Auflistung der Proteinspots C1 bis C5 wurde zu Gunsten der Übersichtlichkeit verzichtet

### • Vimentin, Proteinfleck K1

Nr.	Position in der Sequenz	Sequenz des tryptischen Peptidfragments	Theoretische Masse	Praktische Masse	Spot
1	014-025	<MFGGERPAVSTR>	1307,65 MSO → 1323,65	1323,67	K1
2	031-037	<QYSSPIR>	850,44	850,47	K1
3	040-054	<VSYTSHSAPTLYATK>	1625,82	1625,86	K1

4	069-087	<LLSETLDFALSDAINTFEK>	2127,09	2127,11	K1
5	095-103	<AEMQHLNDR>	1113,51 MSO → 1129,51	1129,50	K1
6	113-119	<FLEQQNK>	906,47	906,45	K1
7	120-129	<ILMAELEQLK>	1187,67 MSO → 1203,67	1203,65	K1
8	136-145	<IGDLYEDEMR>	1240,55 MSO → 1256,55	1256,53	K1
9	161-174	<VEVDRDNLGDDINR>	1629,78	1629,83	K1
10	177-186	<EKLQEEAIQR>	1243,66	1243,71	K1
11	179-186	<LQEEAIQR>	986,53	986,52	K1
12	187-197	<EEAESTLHSFR>	1305,61	1305,66	K1
13a	213-225	<KVESLQEEIAFLR>	1561,86	1561,94	K1
13b	214-226	<VESLQEEIAFLRK>	1561,86	1561,94	K1
14	214-225	<VESLQEEIAFLR>	1433,76	1433,83	K1
15	264-272	<LQYENLASK>	1065,56	1065,50	K1
16	285-294	<FADLTEAASR>	1080,53	1080,54	K1
17	381-391	<MALDIEIATYR>	1295,67 MSO → 1311,66	1311,68	K1
18	401-414	<ITTPMPNFSSLNLR>	1590,83 MSO → 1606,83	1606,86	K1
19	415-429	<ETSLEMRPVMDTISR>	1764,86 MSO → 1796,85	1796,88	K1
20	435-455	<TVETQDGHVINEMTQEHDDE>	2440,06 MSO → 2456,05	2456,08	K1

## 7. Auswertung der MALDI-MS Analysen

Auswertung der MALDI-MS Analysen der Proteinflecken in den 2D-PAGEs. Flecken gleicher Identität wurden in jeweils gleicher Farbe markiert. Der Wert „Anzahl“ bezeichnet alle Peak-Werte, die vorhanden sind. Da die Proteinflecken F1-F5 mit D1 und D2 identisch sind, wurde über die zugeordnete Sequenz gezeigt. Gleiches gilt für die Identität von D5, D6 und D7 mit C1 bis C5 und M1, sowie F10 mit M2 (nicht abgebildet). Gleiche Farben in den Tabellen bedeuten identischen IF-Proteine.



**Tab. 12** Übersicht über die verschiedenen Proteinflecken denen eine Sequenz zugeordnet werden konnte. „Anzahl Massen insgesamt“ gibt die Menge aller praktisch bestimmten Massen des Proteinflecks an. „Zugeordnete Massen“ ist die Anzahl der Proteinfragmente aus dem theoretischen tryptischen Verdau des entsprechenden Proteins, die diesem Fleck zugeordnet werden konnten. „% aller Massen“ gibt das Verhältnis der „zugeordneten Massen“ zur „Anzahl der Massen insgesamt“ an.

Protein-fleck	Anzahl Massen insgesamt	Zugeord-netes Protein	Zugeord-nete Massen	% aller Massen	Protein-fleck	Anzahl Massen insgesamt	Zugeord-netes Protein	Zugeord-nete Massen	% aller Massen
F1	64	K2	37	58	D1	47	k2	31	66
F2	43	K2	32	74	D2	45	k2	33	73
F3	45	K2	29	64	D5	47	Desmin	35	74
F4	44	K2	31	70	D6	48	Desmin	34	71
F5	50	K2	33	66	D7	42	Desmin	29	69
F6	55	K11	32	58	D10	59	K18	46	78
F7	44	K11	28	64	D11	35	K18	28	80
F8	37	K12	27	73	D17	30	K18	23	77
F9	59	K13	36	61	C1	31	Desmin	19	61
F10	53	K10	32	60	C2	51	Desmin	21	41
F11	53	K13	36	68	C3	32	Desmin	17	53
F12	41	K14	29	71	C4	42	Desmin	21	50
M1	48	Desmin	29	60	C5	44	Desmin	18	41
M2	40	K10	28	70	K1	28	Vimentin	20	71

## 8. Nucleotidsequenzen der cDNA-Klone

Nucleotidsequenzen von cDNA-Klonen des Störs *Acipenser baeri*, die für IF-Proteine codieren. Codons die für das erste Methionin codieren sind grün eingefärbt, Stopcodons sind in rot hervorgehoben Nicht-codierende Bereiche (5'-UTR, 3'-UTR) sind grau unterlegt. Die Polyadenylierungssignale sind zusätzlich mit rot hervorgehoben. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung des „sense“-Strangs im FASTA-Format angegeben.

### 8.1 Typ I-Keratine

- AbaK10

```
GCCACTTGAAGCTCCAGGAACTGTTATATCACGCTATCAGCTCCTTCACTTCTTCTGCGTCACCATGTC
CTGTACGTACAAGTACTAAGGTCACCCAACACAGGGTAGGCTCTGTGGCCAGTGTACCCAGGGCGCTC
AGCGTCTATGGGGGTGCAGGTGGAAGAGGCAGTCGTATCTCTTCTGCTTCTATCTACAACCTCTCCTC
TGGCATGGGGTCTGGTGGCGGCTACGGTTCCGGAGGCGGCTTCCGGTCCGGAGGTGGCTTCAGTTCTG
GAGGCGGCTACGGTCCGGAGGTGGCTTCCGGTCTGGAGGCGGCTACGGTCCGGAGGTGGCTTCCGGA
TCTGGTGGCGGCTACAGCATGTCTACTCTGCGGGTGGCGGCATGGGGGGCCAAGACAACCTTGACGAA
CCTCAACGAGAAGGCCACCATGCAGAACCTCAATGACCGTCTGGCTACCTACTTGGAGAAAGTGCCTC
CCCTGGAGGCAGCCAATTCCAAGCTGGAGCTCCAGATCCGGCAGTTTTATGAGAACAGCTCTCCCATC
GTCCAGCGGGACTACAGGCATACCTGGAAGACCATCGAGGACCTGAAGAATAAGATCGGTGCTGCCAC
CATTGACAATGCCAGGATTTTCTGTCAGATTGATAATGCTAAACTGGCCGCTGATGACTTTGGAACCA
AGTATGAGCATGAGCTGATGATGAGGCAGTCCGTGGAGAACGATATTGCCAACCTGCGCCGTCTCCTG
GACCAGACCACTCTACCAAGGCTGACCTGGAGATGCAGATTGAAGGCCTGAACGATGAGCTGGCTTA
```

CCTCAAGAAGAACCACCAGGAGGAGCTGCTGGCCCTGCGTTCTCAGGTGGGCGGGACGGTCAACGTGG  
 AGGTGGACGCTGCCCCACAGCAGGACACGTCCAGAGTCTGGAGGAGATGCGCATGCAGTACGAGGGC  
 ATCGCTGACAAGAACCGCCGGGATGTGGAGGCTGGTACAAAAGATAAGTTCGAGTCCCTGAACCAACA  
 GGTGACCTCCAGCACTCAAGCCATAGAGACCCACAGGTCTGAAATCAACGACCTCAGACGCACAATCC  
 AGGGGCTGGAATCGAACTGCAGTCGGCGCTCAGTATGAAACAAGCCATGGAGAACACGCTTGCAGAG  
 ACAGAGGCTCGCTACAGCAACATGCTGCAGGGTTACCAGAACAACATCAACATGTTGGAGGCTGAGCT  
 GAACCAGGTGAGACTGGACACAGAGCGCCAGGCCACAGACTACAAGCTACTGCTGGACATCAAGACCC  
 GGCTGGAGAAGGAGATCGCCACCTATCGCCAGCTGCTGGACGTTGAAGACAGCAGAATTCCAACAGGC  
 GGGAAAAGATCAATTTATAACCACAACCACCACTACCACAAAACCTTCCCCGCCAAAGTAACTTACAGA  
 CAAGGACGCCACTGCACAACAAAGATGCAGAAGAGAAACAATTTCTACATACTCCAGGCTTAAATCTGA  
 TTCTGAATCCATTAGTCTCCACTATCACTGCATTTGTTTGTATATAAATAAGACGGTACATGATCACA  
 CACAAAAAAATTTGGGAAAGTAAATGTATAGGGTTCCAACATCTCCCGTGATTGGCTAAGCTCAAAG  
 TCAGCTCATTAATAATGAGAATGCAGCATGTAAGTATGGGCAAAGATATTAGATATTATCTTTGGTGT  
 AGGTTAGGCTTATCCCCCTCCCCATACGTGCGTAATACATGAATACATTTCCCTTTAAGACCATTAAA  
 AGATCATTTTTGTCTGCATGTGCTGTCTGTTAATACATACCTTTAACAATTTTATTTCCCACTGCTG  
 TCTTGTCTGCATCTGTTAAGGGGCTTTGAAAAGATTGTTTCCCTATATAATAATTTTCCCTTGGCATTAAAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

- **AbaK11**

CTCCGTCACCTTCTTCTGCATCACTATGCTGTGTACACATCAGCAGGTGTCTCTCTGGGGGGTCTCCAA  
 GGGCTCTGTGATCATCCAACGCAAGGTTCGGCTCAGTGGCCTGTGCACCCAGGGCGCTCAGCGTCTATG  
 GGGGTGCAGGTGGAAGGGGGAGCCGCATCTCTACTTCTGTCTACGGGCCCTCCACTGGCATCTTGTCC  
 GGATATGGTTCTACATGGGGCCATGGTTCCGGAGGCGGCTTCAGTTCGGAGGCGGCTTCGGTTCTGG  
 AGGCGGCTTCGGTTCTGGAGGCGGCTTCGGTTCCGGAGGCGGCTTCGGTTCCGGAGGTGGCTACGGAT  
 CTGGATGGGGCATCTTACCCGGAGGTTGCTACAGCCAAGACAGCATGACCAACCTCAACGAGAAGGCC  
 ACCATGCAGAACCTCAACGACCGTCTGGCTTCTACTTGGAGAAAGTGCCTCCCTGGAGGCAGCCAA  
 CTCCAAGCTGGAGCTCCAGATCCGGCAGTATTATGAGCACAGCCATCCCGTCTGTCAGCGGGACTACA  
 GTGCATACTGGAAGACCATCGAGGAGCTGAAGGATAAGATCAACCGCGCCACCGTTGACAACCTCAGG  
 ATTCTGCTGCAGATCGATAACGCTAAACTGGCCGCTGATGACTTCGTAACCAAGTACGAGCAGGAGCT  
 GATGATGAGGCAGTCCGTGGAGAACGATATTGCCAACCTGCGCCGTCTCCTGGAACATAACCAATCTCA  
 CCAAGGCTGACCTGGAGATGCAGATTGGGAACCTGCGTGATGAGCTGGCTTACCTCAAGAAGAACCAC  
 GAGGAGGAGATGAGGGCTCTGCGTTCCTCAGGTGGGCGGGACGGTCAATGTGGAGGTGGACGCTGCCCC  
 ACAGCAGGACACGTCCAGAGTCTGGAGGAGATGCGCATGCAGTACGAGGGCATCGCCGACAAGAACC  
 GCCGGGAAGTGGAGGCCCTGGTACAAAGACAAGTTCGACATGCTGAGCCATCAGGTGACCACCAGCACT  
 CAAGCCATAGAGACCAGCAGGACTCAAATCAACGACCTCAGACGCACAGTCCAGGGGCTGGAATCGA  
 ACTGCAGTCCGTGCTCAGTATGAGACAAGCCCTGGAGAACACGCTGGCAGAGACAGAGGCTCGCTACA  
 GCTGCACACTGCAAGGTTACCAGAACCACCATCAACATGTTGGAGGCTGAGCTGAACCAGGTGAGACTG  
 GACACAGAACGCCAGGCCATGGAGTACAAGCTACTGCTGGACATCAAGACCCGGCTGGAGAAGGAGAT  
 CGCCACCTACCGCCAACCTACTGGAGGCTCGAGGCTGCCAGATTCCGACAGGTGTAAGAAGATCAATATA  
 TCACCACAACCAAAAAGCTATGTCCAGGTAAAGTAACTTCCAGACACGGACGCCACTGCACAGCGCGGT  
 GCTGAAGAGGAACAGCTCCACACAGTCTTCAATACTCTCTGGCTTCAATCATGCTCCACTCTGAATC  
 TCTGCAGTCTCTTCTATCGCTGTATTGTTTGTATAGAGATGAGACGCTACATGCGCAAACAAAGAAAT  
 GGGGAAAGTAAAAGCTGTTTGGGAGAGAACCTGCAACATCTCCCGTGATTGGTTAAACTCAAATTCAG  
 CTCATTAATAATGTATGTGAATTGGAATGCAGCATGCAAAATGCTGCATTCCAGTATATATATATAT  
 AT  
 CTCTGTCCGTGCATGCATAATGCATGAGTACATTTCCCTTTAAGACCATTAAAGAAAGCATTTGTTCTG  
 TCTGCATGTAAGTGTCTGTTAATACATACATTTGCTTGCATCTGTTAAAGGGATTAAAGCAAATGTT  
 TCCGATATAATAAGCTTTGGCGGTGAAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

- **AbaK12**

TGAGACTCCAGAACTCCAGAACAGCAGTTTCTGAATCTCCTTCATTGTCTCCATCGCCTCTTCTTTG  
 CTCAGCTGAAACCATGACCTCTTCTCCAGCCAGAACAGCAGCTACTCCAGCAGGGGCTTCCAGGA  
 TCTCCTCAGGCTTGGGGCTTACGGCTCATCTTCACTTCCCTAAGTGGTGGGGGTATGAGCGGTGGT  
 CAGAAAGCCATGAGCATGTACGGAGGTTCCAGTAACGTGCATTCCGAATCTCCAGCTCTTCTAGCTC  
 CAGGTCTACTCCAGCGCTGGGGGCTTCCAACCTGGAGATGCCATGGGCGGTGGCTTTTCCAGCCGATG  
 GCAAGCAGACCATGATAAACCTCAATGACCGCTTGGCCATCTACCTGGAGAAGGTGCGCACCCCTGGAG  
 GCCTCCAATGCCACCCTGGAGAAGCAGATCCGCGAGTGGAGCCAGAACCCTCCGTTGTCTCCAGTGA

CTATAGTGCCTACAATGCCACCATTGACGATCTCCGCGCTAAGATTGCGGCTGCACTTAATGTCAATT  
 CTGGGATCATTCTTCACATTGATAATGCCAAGCTGGCAGCTGATGACTTCAGAGTCAAGTATGAGAAT  
 GAGCTGACGATGAGGATGTCAGTCGAGGCTGACATCGCCGGACTGAAGAAGCTCCTAGACGAGCTGAC  
 TCTGTCTAGGTCTGATCTGGAGATGCAGCTTGAGGGTCTGAAGGAGGAGCTGATCTACCTCAAGAAGA  
 ACCACGAGGAGGAACGGCCCTCCGCGCTCCAGCTGAGTGGCAGGTTCAAGTGGAGGTGGACGCA  
 GCTCCAGGAGTGGATCTGGCCAAGATTATTGCGGAGATCAGAGAACAGTACGAAAACATGGCCGCCAA  
 GAGCCGCAGAGATGTCGAGGCCCTGGTACCAGGGCAAGGTTGAGGTCGTGCAGCAACAGGTGACCGAAC  
 ACACCGAATCCCTGCAAAGCAGTAAGACGGAGATCAAAGACCTGAATCGTACCTTGCAAGCCTTGCAAG  
 ATCGAGCTTCAGTCGCTCCACACCATGAAGCAGAGCCTGGAAGCCAACCTCGCAGACACCAACGCTCG  
 CTACTCCGCCAGCTCAGCCACCTGCAGAGTGTGTTACCAGTCTGGAGGCCAACTGACACAGCTGA  
 GAGCTGACACAGAGCACAGCGCTGAGGAATAACGGATCCTTCTGGACATCAAGACCCGCTGGAGTTG  
 GAGATCGCTGAGTACAGGCGTCTGCTGGACGGAGAGGATGGCAGATCCTCTGGCCAGATGCAATCCTC  
 TACTTCGGTTAAAACCTCCACCCGTTACTACTTCTTCAAGCACTACGAAAGTGGTGACCATCGTGGAG  
 AGGTGGTTGGCGGGAAAGTCGTATCCTCTTCTTACTTTCGAAATCCTTGAGCAAGCCATAC**TGA**GAC  
 CCAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG  
 ATTTGGGGATTTCTTCAATAAAAATAAAATTTGGGTGATGCAAACAATATCAACTGTGTTATTGTTTT  
 TTTTTTGCTTTTTTTTTTACTCGAAAATGTGCGTGTGTGTTCCCTGTTAAGAAAATCTCTAGCACTG  
 CTCTTAACCTGGAGTTAGAGGCACCATCTTAGCTTAATCTAAAGCATTTAGCCTGGCTATCGTGGAAC  
 AATTAGGTGCCTTAGCAGTTAAATGAAAATGACCCTCTTCAAACCTAGCAATGCATTAACCTACATTTA  
 TTAATATTTAGAGCACGCCACATGATTGTGTGGATTACATATTTTAAGATATTTACAG**ATTAAACA**  
 TTT**ATTAAAG**CAGAAAACAACAAAAA

- **AbaK13**

GTCTATCCCTGGGGGGTGGTGGTGTGGTTTTGGCGGCGGTGCTGGTTTTGGCGGCGGTGCTGGTTTT  
 GGCGGCGGTGCTGGTTTTGGCGGCGGTGCTGGTTTTGGTGGCGGTGCTGGTTTTCGGTGGCGGCGGAGA  
 TGTTGGTCTCTCCCTCAATGAGAAGGCCACCATGATAAACCTCAATGACCGTCTGGCCATCTACCTGG  
 AGAAAGTGGCACCCTGGAGGCCTCCAACGCCACCCTGGAAAAGCAGATCCGCGAGTGGAGCCAGAAC  
 CGCGCAGTTATCACCCATGACTACAGTGCCTACTGGAAGACCATCGCTGACCTCCGGGACAAGATTGG  
 TGTAGCAAACATGACCAATGCCAGGATTATTCTCCAGATAGACAATGCCAAATTGGCAGCCGATGATT  
 TTAGAGTCAAGTACGAGAATGAGCTGGCAATGAGGCAGTCTGTCGAGGCTGACATCGCCGGACTGAGG  
 AGGCTACTGGACGAGCTGACTCTGGCCAGATCCTCCCTGGAGATGGAGATCGAGGGTCTGAAGGAGGA  
 GCTGATCTACCTCAAGAAGAACCACGAGGAGGAGCTCCTGGCCTTGCCTTCTCAAGTGGGCGGCTCGG  
 TCAATGTGGAGGTGGACGCTGCCCCACAGCAGGACCTGTCCAGAGTCTGGATGAAATGAGAGCGCAG  
 TACGAAGGGATCGCCGAAAAGAACCGCCGAGATGTGGAGGCTTGGTACAAGGACAAGTTCGACGACCT  
 GAACAAGCAAGTGGCCACGAGCACAGAAGTCTCCAGACATCCAAGAGCGAGATCTCAGAACTGAGGA  
 GGACCTCCAGGGACTGGAGATTGAACTGCAGTCTCAGCTCAGCATGAAATCTGCGCTGGAAGGCACT  
 TTGGCAGAGACAGAGGGCCGCTACGGGGCAAAGCTGAGCCATCTGCAAACAATCATCGACAGGCTGCA  
 GACTGAACTGATGCAGTCCGAATGGAGATGGAGCGCCAGGGCAACGAGTACAAGATGCTGCTGGACA  
 TCAAGACCCGTCTGGAGATGGAGATCGCGGAGTACAGGCGCCTGCTGGACGAGAGGATCTGGGAAA  
 GGCTACAATTTCGAACTCTTCTCAAAGGTTGTGGTGCAAAAGTGGAGGAAGTGAAGGCCAAAGCACA  
 TGTTGTTACCAAGACCAGGATGGTAAAGACCATGATTGTGGAGGAGGTTGATGGTGTGGTCAATA  
 CCAGGGAGGAGATGGTTGAGGAGCCATG**TGA**ACAGCACCTCCCAGGCAAGAAGAAGAGCAACGCAG  
 GGCAACAACCTGGTGAAGCAAAAAAACCTTTCTTTTTCTGTTAATTTGATACTGAAATAAATCA  
 AATAAACTAAATGAATCTTCTGAGTATTGTACTGAATACATTCATGCCTATATTTTGGTTGCTCCT  
 TTCTGAAAAT**AATAAA**TAAATGGCTCTTTCTTGCATTGCAAAAAA

- **AbaK14**

GCACATCAAACCCAGTCGCAAGC**ATG**CAGGTCCAGCGTTCTCAGCGGTTCTCCAGCGCCTCAATGG  
 GCGGTGGTGGCGGCGGTTCAATACGCAGGTCCGGTGCAGCTCTTCTTTTCAGCAGCATGGGAGGTGGC  
 ATGGGCTATGGCATGGGTGGTGGCGGTGGTGGTATGAGCTTTGGCATGGGTGGTAGCAGTAGTGGCAT  
 GGGCTTTGGCATGGGTGGTGGCGGTGGTGGCTTTGGCTTCGTAACGGTGCAGGTGCGTTTGGAGCTG  
 GCGGTGGCAGGGGCGGCTCCTTCATAATGGGCAACGAGAAGCAGCACATGCATGAACTGAATGACCGT  
 CTGGCCACCTACCTGGAGAAGGTGCGCACCTGGAGGCAACCAACAAGGACCTGGAGGAGAAGCTGAG  
 GAACCTCACAACCTCAAGGTGGAGAGCCAGACTATTCTGCCTACGAGGCGAGCTGAAGCCAAATCA  
 GAGACCAGATCATTAATATCATCTGGAGAATGCTCGTCTGGCCCTGGAGATGGACAATGCAAAGCTG  
 GCTGCCGATGACTTCAGAATGAAGTTTGGAGGCGGAGTATGCAATCCGCCAGTCAGTGGAGGCTGATAT  
 CAACGGGCTGGGGGCTTGAAGAAGGAGTACGAGTTCAACCACAAGACTCTGCTGCAGGACATCGAGG  
 GGCTGAAGGATGAGCTGGATTTCTAAAGAAGAACCACGAGGAAGAGCTGGCCTCGCTCCGCTCGGAG  
 ATGAGTGGCACGGTGTGGACCTGCAAGCTGCTCCTGCCGTGGACCTGCAGAGAGTCTGGACGA  
 CATCCGTGCCGAGTACGAGGGCGTGGCGCGACGCAGCCAAGAGGAGGCGGAGAGGTGGTTCGTGAAGC

AGGCTGAAACGAAGCAGGCAGAAGTAGCTCAGAGCACCGAAGCTCTCCAGTCCACGAAGACGGAGTTC  
 ACCGATCTCAGACGCCAATACCAGAACCTGCAGGCCGAGCTGGACGCCCTTAATGCTTCGAAATCCTC  
 TCTGGAGCAGGTGCTGATGGATACAGAGGGGCGCTACCAGATGCAGCTGCAGCAAATCTCCGCCATCG  
 TGGGCCGGCTGCAGCAGGAGCTGATGAACGTCCGCGACAGCATGACAGCCCAGTCTCAGGAGTACCAG  
 AACCTGCTCAACATCAAGATGAAGCTGGAGATGGAGATCGCCACATAACAAGAAGCTGCTGGAGGGGGC  
 GGAGCCGGGGCCGTCATGCTTGGAGGGGGAGGAGCTGGTGTCAACACTTCCAGACAGTCTGTGATAA  
 CAAAGGAAACAAAAACAGTGACCACC**TA**ACGCCAGGAAGAACGGGAGACAGACGGACGGACGGACAG  
 GCAGACGAACGCACACGCTTCTCCTGCGAACACAATAAAATGCTTAACGCCCTTCACTCTTTTTTCTGT  
 TTCTGAGTTTCTGCACCCTTTGTTAAAGCTCCCCACGCTATCCCATGCACAGCGAAAGTGTAGTAAAA  
 GCACTGGCCGTCCGTGCATGGCATGATAGTCTTGGATAGTCTTCACTTGTACTGTAGATTGGGAATCT  
 CTTTACTTCTGTCTGGGTGTTTTCTTTGTAAGGTGGACAATAAAAGAAGAGCAACCCGCATGTACCCTC  
 TCCGCCCTCTCATTGCTGATTGGATAAATTGATTGGCCCTGTGTGCTGTTTCATCTACTCTGACAATAC  
 AAGCTTATGCTCAGCAACCCCTGTGGAGCTCCAGCAAGACACAGGAGAGCTTTCAGTCCCAGCTCAGC  
 CAGCCCCTCGTGTCTGACTGCTCCCTATTCCCAAACCTCAACAACCTCATAATGA**AATAAA**GTTTGGTA  
 TTCAGAAAAAAAAAAAAAAAAA

- **AbaK15**

CTAAGCAAGAGAAAAGGCTCTTTGGCACA**ATG**TCACACTATTCCACTCGCAGTTTCAGCACTAGATCC  
 TCTGATGGTCTCACCAGCAGGCCTGCAACTCTGATGAGCTCGTCCCGACTCTATTCTAGCGCAGCCCC  
 CCACAGGGCCCTGAGCACCTACCGGGGCGCAGGGGGGCAAGGCACCCGCATCTCCAGCGCCAGCTACT  
 CCATGCCCTTTCCAGTGCAGGTGGAGGAGACGGCTTTTCTTAAGCAGTGCCAGCTCTGTGGCCCTCC  
 AACGGCAAACACACCCATGCAGAACCTCAACGACCGCCTGGCCACCTACCTGGAGAAGGTGCGCACCCCT  
 GGAGGCATCCAACGCCACTCTGGAGAAGCAGATACGTGAGTGGTACGAGAAGAAGGGGCCAGTTCTCC  
 AGGACTACAGTGCCTATGAGAAAACCATCGATGGACTGCGCGCACAGATCAGCGCCACTGCCATGAA  
 AACGCCAAGATCCTCCTGAGGATTGACAATGCCAAACTGGCCGGCGATGACTTTAGAATGAAGTACGA  
 GGCTGAGCTGGCAATGAGGCAGTCTGTGAGGCTGACATCGCCGGACTGAGGAGGGTCTCGATGAGC  
 TCACTCTAGCCAGATCCTCTCTGGAGACAGAGATCGAGGGTCTGAAGGAGGAGCTGATCTACCTCAAG  
 AAGAACCATGAGGAGGACCCCGTGCTCTGCGCTCTCAGATGGCGGGAATGTCAATGTGGAGGTTGA  
 CTCTACCCCTGGGGTGCACCTGACCCAGGTCTTGGCTGAGATCCGATCCAGTACGAGGGCATCGCCA  
 ACAAGAACC GCCAGGAGATGGAGGCCCTGGTACAAAGACAAGTTTGATGCCCTCAACCAGCAAGTGTCC  
 TCCAGCACTGAAGCCCTGCAGTCCAGCAAGACTGAGGTCTCCGAAGTCAAACGCACTATCCAGAGCCT  
 GCAAATTGAGCTGCAGTCCCACCTTAGCCTGAAAGAAGCGCTGGAAGGCACTCTGAGTGAAGCGAAC  
 AGCGCTACGCAGCTCAGCTCCAACAGCTGCAGTCCATCATTCTCAGGTTGGAGAATGACCTGAGCCAG  
 GGGAGAGAGGACATGAGAAGGCAGAGCGACTACAAGGCCCTGCTGGACATCAAGACCCGGCTGGA  
 GATAGAGATCGCTGAGTACAGGCGCCTGCTGGACGGTGAAGAACGCGCCCCGTTCAAAGAGCACCAG  
 TTGTAACCACCAGAAAGGTGAAGACCATTGTGGAAGAGGTGGTTAATGGGAAGGTTGTCTCGTCCCGC  
 GTTGAGGAAGTTGAACAGAAGAT**CTAG**ACCAAGGCATTTTTTTTGGCCCTGCAGACCCTCAGCTGGGC  
 ATCACAAGGTGTCACCTAAAAACAATTCAAGTCAAATTAATAAGGGAATAATTGACTCGAATTCAAT  
 GGTGGTGGTTTTTTTGTGTTTATAAATACTTTAAGAATGCTTTTTTGTCTCCCTTACTGGTGA  
 TGCAACAACACTGATGTGCAAGACAAGCTTGTGTAATGTGTACTTTTTGTTT**AATAAA**ATGTTCT  
 CTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

- **AbaK18**

CCTGCAGGTTTCGACACTAGTGGCATCCAAAGCTTGTTCAGGTACAGCTGTTGTAGTCTCTCTCTCCCT  
 GCCTTCCACACTTCCAAA**ATG**AGTTACAGGCCAGGCAGTTACTCGGTGAGCTCCATGAGGCCAGTGGG  
 CTCTGTCCGTTCCAGCCAGGTGATGACGGTCCAGAGGTCCATGCCCTGGCCAGCGCTGCCAGTGTGT  
 ACGGCGGTGCCGGGGCAGGGGGTCCCGGATCTCCGTGCGGGGGTCAATCAGGGTTCGGATCCGGC  
 TTAGGCTCCGGGGCTGGTGGCTCCTATAGCTCCATGTGAGTCAAGTGGCAGTGGCCTGGTGGGCAACGA  
 GAAGGAGACCATGATCGGCCATAACGACCCGCTGGCTGCCTACCTGGAGACTGTGCGCAACCTGGAGC  
 AGGCCAACAGCAAGCTGGAGTTCAGATCAGAGAGGCCCTGGAGAAGAAGGGACCCACCACCCGAGAC  
 CTGAGCCCCTTCGAGAAGACTCTGGAAGACCTGAGGAAGAAGGTGTATGACATGACCATGGACAATTC  
 ACGTTTGGTGTCTCAGATTGACAATTCGCTTGGCTGCTGACGACTTCAAGTCAAGTTCGAGTCCGG  
 AGTACAGCATCCGTGAGTCCGGTGGAGAGTGCATCATCGGTCTGCGCAAGGTCTCGATGACACCAAT  
 ATGGGCCGCATGAACCTGGAGAGCGAGATCGAGTCTCTGAAAGAGGAGCTGATCTTCATCAAGCAGAA  
 TCACAACCAGGAGGTGAATGATTTGCGCAACCAGATCGCCAGTCCGGAGTGCAGGTGGACGTGGACG  
 CTCCAAGGGTCAAGACCTGGCCCAGGTGTTGGCGGAGGTGCGCGCGAGTACGAGAGCATGGCGCAG  
 AAGAACAGGGATGAACCTCAAAGCATGGCACGAAAACAAGCTCACAGAGGTGGAGGTGGAGGTCATACA  
 GAACACAGAGGCTCTGCAGGGGGCCAGGACAGAGGTGACAGAGCTGAGGAGACAGATGCAGTCCCTGG

AGATCGAACTGGAATCCCAGCGAAGCATGAAAGCGTCACTTGAAGACTCGCTTCGGGACACGGAGATG  
 CGCAACAACATGGAGATGGAAAGGTACAACAACATGATCCTGCAGCTGGAGGCGGAGCTGGGACAGCT  
 GCGAGGAAACATCCAGATGCAGGCGTCCGGAATACGAGGCGCTGCTCAACATAAAGATGAAGCTGGAGG  
 CAGAGATCGCCACCTACAGGCGGCTCCTGGACGGGGAGGACTTCAGGCTCCAGGATGCCCTGGTTGAT  
 CAGTCCAGCACCAAGAGCATTAAAGAAAGTCACTGTACACAGACCCTGGTCGACGGCAAGGTGGTGTG  
 AGAGAGCACCAACACCAAGGAGATTGGGAAGTGA GCCCTACCCCTACTCGAGAGGGGTACAGCTGCA  
 GCCCCCTAAGCAGCTGAGAGATATGATGCTGCTGAGAAGGCTCCTGCAGTGATACCCTATTGCCCTAC  
 TCTCTCCCCACTAACAAAAATATATTGCTTAGAAAAGAAAAGTAAAAAGAACCCACAATGCAACAGCAAC  
 ATGACTGCTGGCTCCTGTGTGCCTCAGCAACTGTGTAAGTGCCTGGCGATGTTCAATAAAAGCAACC  
 CCTTTTCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

## 8.2 Typ II-Keratine

- **AbaK1**

GCTATCCAGCACTGTTTCTTCTGCTCTTGTACCTACAAAGCCAAACCAAGCCATGCTCTCTGTTGGGAA  
 GCAAGCGAATTAGCATCAGCACCAGCAGCCTGAACAACAGGTCATCTCGGTCTGGGGGACAGCAGCATG  
 AGCCAGAGCGGCCTCTACAGCAGTGGGCAGATTAGAATGAGCAATGGCTACAGCTCCTACAGCTCCAT  
 GGGAGGAAGCATGGGTGGAGGAATGCGTCTCCCCAGCATCCCCATCTCCGCAGTGACCTACAACAACA  
 GCCTGCTGGCCCCCTCAACCTGGAGATCGACCCCAACATCCAGGTGATCCGCTCCCAGGAGAAGGAG  
 CAGATCAAGGGCCTCAACAACCGCTTCGCCTCCTTCATCGATAAGGTCCGTTTTCTGGAGCAGCAGAA  
 CAAGATGCTGGAGACCAAGTGAATCTAATGCAGGACAGACCACCACCAAGTCCAACATCAACGCCA  
 TGTTTCGAGGAGTACATCGCCAACCTGCGCAGGCAGCTCGACGCCATCAACAACGACAAGAGCAAGCTG  
 GACAGTGAGCTGAGGAACATGCAGGGGGCCGTGGAGGACTTCAAGGGCAAGTATGAAGATGAAATCAA  
 CAGACGCACCGGTCTGGAAAACGACTTTGTGCTCCTGAAGAAGGATGTGATGGTGCCTTCATGGTTA  
 AGGCTGATCTGGAGGACAAGGTTGGCTCCCTGAGCGACGAGATCAACTTCTGAGGAGCATTTACGAG  
 GAGGAACTCCGCGAGATGCAGAGCCAGATCAAAGACACCTCCGTCGTGTCGATGGACAACACTCG  
 TCACCTGGACATGGACTCCATCGTGGCTGAGGTCAAGGCTCAGTATGAGGACATCGCTGCCAAGAGCC  
 GCGAGGAGGCAGAGTCCCTGGTACAAGGTCAAGTACAGTGAGATGTCCTCCCAGGCTGGCAAATATAGT  
 GATGAGCTACGTAATACCAAAGGTGATATCGCTGAGCTGAAGCGCATGATCCAGAGACTTGAGAGTGA  
 GATCTCGTCCATCAAGGGACAGCGTGCCACCCTGGAGGCTCAGATCGCTGAGGCAGAGGAGCGCGGGG  
 AGCTGGCAGTGAAGACGCCAAGGCCCGTATTGCAGATCTGGAGGCTGCTCTCCAGAAAAGCCAAGCAG  
 GACATGGCCCCGCCAGTCCGGGAGTACCAGGAGCTGATGAACGTCAAGCTGGCCCTGGATATCGAGAT  
 TGCCACCTACAGGAAGCTCCTGGAAGGAGGAGGAGCAGGATTAGCAACCCTCAGTTGTGCTGATGCTC  
 ACTCTGCACCATCCTACAGCCAGTCCAGCAGCAAAGGTATGCATGCCGGTGGCTACTCCACCAGTGGT  
 GGGTACAGCTCCTCCTCCTGTTATAGCACAGCTCAGACCACCAGGAACGTGGCCGCTAAGAACGTG  
 GTGATCAAGATGACCGAGACCAGCGACAACCGATTCCGCAAGTAAATCGGAGAAGAACCACAGGCATC  
 AAAACAACAAAATCTCCGCTGTCGTTACGTGACGCCTCACTATTGCCAGCTTACAGCTACCCGTAGAG  
 ACCTGTTCTGTTCCCATTTTTTTAGAGAAAATATATGTGGCATGTAATAAAGGGAATGAGCTTCAATCAA  
 TGATTATTGCTCTTCGGGAACGATTATCGGATCCAACAATAATGCTGACCGACGCTTGTCCCTTTTATT  
 GCATGAATATTGTCTATCCAAATGTAATTTTTCTGAGACAAAAAGGGGGAATTGAGTTGAGAACCCAA  
 TGGACCAACAAGTGCCCTCTGGTTAGCTAAGCCGTCAATAGCAGGGCGTCACTCTTGGTGTATTCCCT  
 GGATTTCCGTTGTTCTTTGGTTTATGTTTTTATGTAACCTAACAAATACTGTCCCTCGACTGCTTGA  
 AAGCTCTTCTTTTATGAATCAACTCCTTTCTGTAGAATCCAATGCCGCTGGGAAATTGGGGGTGTTT  
 ATTAATGTGGTCTTAACAGAACCTCCAAGTTCTAAACGGGGCCAGCTTGTAACCAAAAAATAAATC  
 AACCACCAAGTTGGGGGCTTGTCTTCTTGTCCGAGCAGTCTAAATCCCACAGAATTTCCATCCCTG  
 GTGATACCGTACTAAACTTCTTCTTTGTATTCCATTAGTGCTTGCACAGTAACTGTCTTCAGAAA  
 AGTGATAGAAGGTATGCATTCAATAAAAAACACACATATATATACAGCTACCGTATTATTTACTGT  
 TTTATAACCAACATTAATCCAGAGGCGCAGGATATATGTGTGTTTCAGTATTTAACACAGGTGTTACA  
 TGTTATACTGTACAATGCTTCCATGTCTGAAAAGTTTGATTGAACAGTGCCATAGATCAGCACATTCCG  
 AGGTAATGCAAGCAGACACATCAAAGGTGGTTACTGTAGATCAGGCCGAACTAGGCTGCCTTACAGCT  
 TTTAAATCTGTACTACGTACTAATGAATAAAAGTACTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

- **AbaK2**

GTGGCGGCGGCTTTGGCGGAGGGTATGGTGGCGGCATGGGGATGGGTGGCGGCATGGGGATGGGTGGC  
 GGCTGGGGATGGGTGGTGGTTTCGGTGGCGGACACGGTGGCGGTTTCTGTGGCGGAGGTTTCGGTGG  
 CGGCATGGGCGCCCCATCACCCGAGTGACCGTCAACCAAAGCCTACTGGCCCCCTCAACTTGGAGA  
 TCGACCCCAACATCCAGGTGATCCGCTCCCAGGAGAAGGAGCAGATCAAGGGCCTCAACAACCGCTTC  
 GCCTCCTTCATCGACAAGGTCCGTTTTCTGGAGCAGCAGAACAAGATGCTGGAGACCAAGTGAATCT  
 AATGCAGGGACAGACCACCACCAAGTCCAACATCAACGCCATGTTTCGAGGCGTACATCGCCAACCTGC  
 GCAGGCAGCTCGACTCCCTGGGCAATGACAAGATGAAGCTGGAGAGCGATCTGTCTAATATGCAGAAC  
 ATGGTGGAGGACTTCAAAAACAAATACGAGGATGAAATCAACAAGCGTGCCAGTGTGGAGAACGAATT  
 CGTCTGCTGAAGAAGGATGTTGATGGTGCTTACATGAACAAGGTTGAGCTGGAAGCCAAGTTCGATG  
 CGCTTCAGGATGAGATTAACCTCCTCAGGGCCATCTACGAAGAGGAGCTTCGCGAAATGCAGTCCCAG  
 ATCAAGGACACCTCGGTGGTGTGGAGATGGACAACAGCCGTAACCTGGACATGGACTCCATCGTGGC  
 CGAAGTGC GCGCTCAGTACGAGGACATCGCTGCCAAGAGCCGTGCCGAGGCTGAGAGCTGGTACAAGC  
 AGAAGTACGAGGAGATGTCCACCTCCGCCGGACAGTACGGGGATGACCTGCGCAACACCAAATCTGAG  
 ATCGCCGAACTGAACCGCATGATCAGCAGACTGACCTCTGAGATTGAATCTGTTAAGGGCCAGCGCGG  
 AAACCTGGAGGCTCAGATCGCTGAGGCAGAGGAGCGCGGGGAGCTGGCAGTAAAAGACGCCAAGGCC  
 GTATTGCAGATCTGGAGGCCGCTCTCCAGAAAGCCAAACAGGACATGGCCCCGAGGTCCGGGAGTAC  
 CAGGAGCTAATGAACGTCAAGCTGGCCCTGGATATTGAGATCGCCACCTACAGGAACTCCTGGAAGG  
 AGAGGAGAGAGAATCAGCTCAGGCGGTGGAGCAGTACACATGCAGCAGAGTGTATCTTTCAT  
 CTGGAGGCGGATTCGGAATGGGAGGAGGAATGGGAGGAGGAGGCGGGCGGTGGATTTCGGAATGGGAGG  
 GGAGTGGCGGCGAGTGGATTTCGGAATGGGAGGAGGAATGGGAGGAGGAATGGGAGGAGGCTCTATGAG  
 TGGTGGAGGATACGGAGGCTTTAGCGGCGGCAGCAGCGGCGGTGGTGGTGGCAGCAGCAAAGTGTCTT  
 ATTCACAATCCTCCACGACCAAGACCAAGCGCTACTAAACCCTCGACCCCCCCCCCTTCGAGAACGGG  
 TTTTCGGCCTCTTCAGTTCACACGTTTCTCTATCCCCTCAAAGATCTTTCTATAGGTCTGTCTCT  
 ATCAGTTGGCGCCTGTGTCAACAATCTTGTATTTTTTTTTGGAAAAGCAAACTCAAACATCCAAAGAA  
 ATATGTTGCAAATGTTTGTGTTGGAGATGGATGGGGGAGTGTGGGGTGGGGGCTTCTCCTTTTTTAA  
 TGTTCGTATTGTCTTCTTTTTGTTGCCTCTTGTGGACAGATTGTATGAATGCAATCGTCTTTTC  
 TAACATCATCTCTGCATAAATCCGAGTTTCTAAATGAAGCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

- **AbaK8a**

TTTGAGCAGGTGCGTATTTCTTTGCACTAGCACACAAACAGACACAAAATGGCCTACAATAGAACTC  
 TGGTGCCAGGACCTTCAGCAGCCGTTCTTACAGTTCTCCGGGCAACAAAATGAGTGTTCCTCCGAGTAA  
 ACAGCGCCTACTTCCCCGGCAACAGGACTGGACCGTCTGGAATCAGTGCTTCGTGGGCTACCCCGGTC  
 TCCTCTGCTGGGATACTGCTCTCAACCCTCCCAACACCGAAATAGATCCCCGTTTCCACCAGATTAA  
 AACCCAGGAGAAGGAGGAGATAAAAGGACTAAATAACAAATTTGCAGATTCATTAACAAGGTGCGTC  
 ACCTGGAGCAGCAGAACAAGGTTCTGGAGACCAGGCTGAAGATCATGCTAGAGAAGGGCGACTACAAG  
 TCCAACATCGACCAAATTTGTGGCCGCGTTTGGCAACAACCTGACGAGCCAGAGAGACAGGCTAAGCAA  
 TGACAGGGACAAACTGGAGAAGGAGCTGGCTCGCACTAAGGCACCTGGTGGAGGACAACAAAAACAAGT  
 TTGAGGATGAGATCAACAGGCGTACTCAGTTAGAGAATGAGTTTGTGCTCAGCAAGAAGGATGTAGAT  
 GAGGGCTACCTCCAGAAGGTGGATCTGGAGAATACCGTAGAGAGCCTGATGGACGAGCTGGCCTTCTT  
 GAAGCAGCTCTATGATGAGGAAATCCGTGAGCTGCAATCTCAGATTAACAACACAGCAGTTACCGTGG  
 AGATGGACAACAACCGTGGTCTGGATATGAAGCAAATCGTGGAGGAGGTGAAGATGCAGTATGAGGGG  
 ATCGCAGTGC GAGGCCGAGACGAAGCTGAGCAGTGGTACAAAAACAAGGTGGATGACATGGCGGCTGA  
 GGCTGGGAAGTACAACCAGGACTTGAAGGGAGTGAAGAATGAGATTGTAGAAATGATGCGTCTCATCC  
 AGAGACTCAACTCTGAGGCTGAGGGCTTGAAGAATCGACGAGCCAATCTTGAGATGGCCATTTGGAGAG  
 GCAGAGGAGCGGGGACAGCTTGCAGTATCAGACGCCAAGAACCCTGTGAGTGAGCTGGAGGCAGCCCT  
 GAAGATGCCAAGCAAGCCATGGCCAAGCAGGTGCGCGAATACCAGGACCTCATGAACCTCAAGCTGG  
 CCTTGAAAATTGAGATTGCCACCTACAGGAAGCTCCTGGAAGGGGAGGAGAGCAGACTGGGAACCCAC  
 CAGCAAGGAGGGCCCCGCCAGGACTCTCAACTCAGTGCCATTGACCAGCTAGATTTCTAAACCCTGT  
 GTGCCCTGCTTACGTAGATGGCCTGGTGCAGTCCCGAAGCCTGGACCTCTCAAGAGCAGCACCCCTA  
 AGAAAAGCTGTGCTCATCAAAACCATCGAGACCAGAAACGGTCAGGTGATCTCAGAGTCTCCACTTC  
 TCTGAGGACTGAGGATCCCGACGAGCGGGCTGCTTCGTTTTTAAACATGTATTTTGGGGAAAAAAAAAT  
 CTCAGGTGGTGGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTAAGACTAGAATAGCACTTGGAGTCATATTTTATTT  
 TTGAGCTTAGCCAGTCCATACATAACTCCTGCTGTTGATTTTATAATTTCAATTATAAAAAAAAAAACC  
 TAAAAATGGCTCAAGGTGCTATTCAAGTTGGACTTACACCCTGTATAACACTCTTGTATAATGCTCTTA  
 TAGACTAATAATGCGAAAATATAATCTACACTGTAGAAATGTGATAAACTTGATAAATAAGTCGCTT  
 GCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

### 8.3 Typ III-Proteine Desmin und Vimentin

- **AbaD**

CAAGAACCAGTAGTCCTAACTGTTCCACTCCAGTGCCACCATGAGCCAATCTTACTCTTCCAGCCAGA  
GGGCATCCTCTTACAGAAGGACCTTCGGGGGGGGCGCCGCCGCTTCCCCACAGTTCTCCAGGGCCTCG  
TACTCCAGCCGCGGGGCCGGCAGTGCTACCTCTGCTTCCAGGGTCTACCAGGTGTCCAAGAGCTCAGC  
CTCCCCAGCTTCTCCAGCTATCGGGCCAGTCGGGTGGCCCCCTCCGAGTCTACGGCGGAGAGACCC  
TGGACTTCCAGCCTGGCTGATGCCATGAACCAAGAGTTCCTCCAAACACGGACCAATGAGAAGGCTGAG  
CTTCCAGCACCTGAATGACCGCTTTGTGAACTACATTGAGAAGGTGCGTTTCTGGAGCAGCAGAACCA  
GACCCTGGTGGTGGAGATCGAGCGACTGAAGGGCCGGGAGCCGACACGCGTGGCTGAGATCTACGAGG  
AGGAGATGAGGGAGCTCCGCAGGCAGGTGGACATCCTCACCAACCAGAGGGGACGCGTTGAGGTGAG  
AGGATGCTGAGAACAACCTGGCTGCCCTTCCAGAGCAGATGTGGATGCCGCCACCCTGGCCCGATTGACC  
TGGAGAGGGCGCATCGAGTCCCTGCAGGAGGAGATTGCCCTTCTCAGGAAAAATCCACGAGGAGGAAATC  
CTCGAGCTGCAGGCTCAGCTTCCAGGAGACCCATGTTCAAGTGGAGATGGACATGTCCAAGCCTGACCT  
GGCTGCTGCCCTGAAGGACATCCGCAGTCAATACGAGAACATCGCTGCCAAGAACATCCAGGAGGCAG  
AGGAGTGGTACAAGTCTAAGGTTACAGACCTCACCAAGCTGCCCTCAAGAACAACGATGCCCTGCGC  
CAGACCAAGCAGGAGATGATGGAGTACCGTCACCAGATCCAGTCCCTACACCTGCGAGATCGACTCGCT  
CAAGGGAACAAATGATTCCCTGATGCGCCAGATGAGGGAGATGGAGGAGCGCTTCTCGGGGGAGGCGT  
CAGGTTACCAGGACAACATCAGCCGGCTGGAGGCGGAGATCGCCAACATGAAGGATGAGATGGCACGC  
CACCTTCGTGAGTACCAGGACCTGCTCAATGTCAAGATGGCTCTGGATGTGGAGATCGCCACCTACAG  
GAAGCTGCTGGAAGGAGAGGAGAACAGGGTTAGTCTTCTATAACAATCATCTCTTTCATTGAGTTTTA  
GAGAGACCAGCCCTGGACAGCACCCAGCGCAAGTCTGAGGTTCACTCCAAGAAGTCAGTCGTCATCAAA  
ACCATTGAGACCCCTGATGGGGAGGTCGTGAGCAGTCCACACAGCAGCAGCATCAATCAATCAAAAC  
ACAGAAGCGGATGGACAGACGAACACCCATACACTATAGCTACAAGCATGGATGCTTTACACACGAAC  
AGTACAGATAC  
CTTCGACTCTGAAGCAGCATGGATGAGAACGTCTCGAGAAGAAGGAGAGAGAATGTGAAGGGAATTCT  
CTATTTTTGTAGTTACTGTAGTATCGATAAGCAATAAACTTCAAGTGTGCGCTAAATTGTAATAAGATG  
AATTTCTTGAATGTTAAATTTCTATCTGTGTATCCTGTAACGGCCAGTCTCTGTAAGGGATAGCTAA  
CCCCATTGCTGTGACAGTATTGCCATTGAAGTACTGTACCCATCACTGCCAGGGCCAGTCTCTGTAA  
GGGATAGCTAACCCCATTTGCTGTGACAGTATTGCCATTGAAGTAAAGCATTTCATATTTGTTACACA  
AGAATGTCAATAACATGCATCCCATGTCACGGCTGTAGATTCAAAATATGAGCTATCAGTATGACGAA  
AATGTTATGACCGTGATGTATATCGAAAGTCCGTACAGAATAGCATCGAATATAGCATGCCAATGAGT  
ACTTTAATGAAGATTGGATAAGTGTATCATCAGCAACAAGGTGTGTGTATCATGGTAAATTTATATT  
AAAATGACTGATTTACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

- **AbaV**

GGTCTCTGGAGGCTGCAGAAGAAACCTAATTCCAAGAAACACAGAACTTCAATAAAAAGAAAGGATTA  
CAAAATGCTCTACAATGAATCGGCAGTCTGCTCCTTACAAAAGGATGTTTGGTGGTGAGAGACCAGCGG  
TTTTGACCCGGTCATACTCAAGTCGACAGTACTCCAGCCCTATCCGATCCAGGGTTTCTTACACCAGC  
CACTCAGCCCCGACTCTCTACGCGACCAAACTTTCATCCACGAGGCTCAGAAGCAGCGCTCCTCAGAC  
CAGGCTGCTTTCTGAACTTTGGATTTGCGCTTGTCCGATGCCATCAACACTGAATTCAAAGCCAACA  
GAACCAATGAAAAGGCGGAGATGCAGCACCTTAACGACAGGTTTGCCTCCTACATCGATAAGGTGAGG  
TTTCTGGAGCAGCAGAACAAGATTTCTGATGGCCGAGTTGGAGCAGCTGAAGGGAAAAGGCACCACCA  
GATCGGAGACCTCTATGAGGACGAGATGAGGGAGCTCCGTCGTGAGGTGGACAAGTTAACCAACGAAA  
AGGCGAGGGTGAAGTAGACCGAGACAACCTTGGGGATGACATCAACAGACTAAGAGAGAAGCTCCAA  
GAGGAAGCAATCCAACGGGAAGAAGCTGAAAAGCACTCTTCATAGTTTTAGACAGGATGTTGATAACGC  
ATCTTTGGCACGTCTGGATCTTGAGCGTAAGGTTGAGTCACTGCAGGAAGAAATTGCCTTTTTGAGGA  
AACTCCATGATGAAGAACTCGCTGAACTACAGGTCAGATTCAGGAACAGCATATCCAAATCGACATG  
GATGTTGCCAAACAGATCTCACTGCTGCTCTGCGTGACGTTTCTGTTGAGTACGAGAACCTCGCTTC  
GAAAACATGTCTGAATCTGAAGATTGGTACAAATCCAAGTTTGCAGACCTTACTGAAGCTGCATCCC  
GTAACAGCGAAGCCCTCCGCCAGGCTAAGCAGGATTGCAATGACTACCGCAGACAGGTCCAAGGACTT  
ACCTGTGAAGTCGATGCACTCAAGGGAACCAACGAGTCTCTGGAGCGCCAGATGCACGAGATGGAGGA  
GAACTTTGCTCTTGAATCTTCCAACCTACCAGGACAGTATTGCTCGCTTGGAGACGACATCCGCAACA  
TGAAGGACGAGATGTCCCGTCACTGCGAGAGTACCAGGACCTGCTGAACGTGAAGATGGCTCTGGAC  
ATCGAGATCGCCACATACAGGAAGCTGCTGGAGGGAGAGGAGAGCCGAATCACCACACCTATGCCAAA  
TTTTCTTCTTAAACCTGAGAGAAACAAGCCTTGGAGATGAGACCAGTTATGGATAACATTTCCAGGA

AGGTCCTGATTAAGACTGTTGAGACTCAAGATGGACATGTTATCAATGAGATGACCCAGGAGCACGAT  
 GACCTCGAGTAAGCATCTGAAAGTCCGAGCATGAAATGTTTCATTCAAGCAAGAAAAGAAATGACCCC  
 TTGAGAAAAAATGTCTCTTGAGGAAAAAAGTGAATAACAGCTTTAAAGTGCCTTTCTGCA  
 GTTATCTGAGAGCGCCAGATAGAGTTATGTTAGAATGTAGGCTTTGTAGGTCTGCAAAACGGGTAGC  
 TGACATACAGTTTACTACAGAGACTCTAGTTTAGATTACAGACAGTAAGACAATAGCAATATCCTGAAC  
 AACTGTACCAATCTTTATTAATTTACCATTTCAAATTAATAACTGCTGTTTCCATCTGATGTTTATGCA  
 AAAAAAGTCACTGCTTCAGTAAGTCAATAAACATTGGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

## 8.4 Typ V-IF-Protein Lamin

CTGGTTCAGAGGGGGAGTGGAGTCTGTGTTACTGATAATCGCTTGGTTTTCCAATGGCTTCCATGCC  
 TACCTCGACTCCGGCCAGCTCAGGCCGGAGCACTCGGAGGAGCACCGGCGTGGCGTGTCCCGGCAG  
 GATCCGGCTCCAGCCGACTCGCTGAGCCGCTCCAGGAGAAGGAAGAAGTGGAGCTGAATGAC  
 CGCTGGCGAATTACATTGAGCGAGTCCGCTCGCTAGAGACGGACAAAGCATCTCTGCAGCTCCTACT  
 GGAGGATCGAGAGCAGTCTCGTCTCGGGAGATGGGAAAGATCCGGCTGCTCTATGAAACAGAGCTCG  
 CCGACGCGAGGAACTGCTGGACAACACGGCTAACGAGAGGGCTAGGCTTCAACTTCAGTTTAGCAA  
 GTCACAGAGGACCACCGACAACACTACAGATAAGGTACAATAAAAAGGAGACTGACTTGGCTGCTGCTGT  
 GGGCCGCTTGAGAAATCTTGAAGCTCTACTGAACTCCAAAGAGGCAGAATTGGCAAATTTACTGGCTG  
 AAAACAGGCGTTTAGAAAGTGAACTTTTTGAACCTCAAGGCTCAGACTGCCAATCTTGAATCTGTGTTA  
 CATGATGTTAAGAAACAGCTCCACGATGAAATGCTGCAAGAGTTGACCTTGAAAATCAAATGCAGAC  
 ACTACGGGAACAAATGGAGTTTCAGAAACACATCGGTGAAGAAGAACTCAGGGAAACCAAAGTGCCTC  
 TTGAAACTAGACTGGTTGAGATTGACTCTGGTCCGACAGAGGAGTTTGCAGCAAGTTTTTCGAGGCC  
 ATGCAACAGCTCAGAAGGGAACATGAAGGCCAAATCCAGCAGTATAAGGAGGAGCTAGAAAGAACTT  
 TATTGCCAAGCTGGAGAATGCACAGCATGCTGCTGCCAAGAACAGTGATTTTGCCAGCTCTGCCAGGG  
 AGGAGCTAATGGGGTCGAAAATGAGGCTTGAACCTTGTCTCTCAGCTCGGCCACTATCAGGAACAG  
 AATGTTGCCCTTGAGACCAAATAAGGGAAGCTGAGGATGCACTGGACCGGAGAGAGAGATAAGCCA  
 TCGACGCCCTAAGTGAAGACAGAGAAATGACTGAAATGAGACGGCAAATGCAGACCCAGCTGGAAG  
 AATATGAGCATCTTCTGGATGTGAACTGGCTTTAGACATGGAGATCAATGCTTACAGGAAAATGCTG  
 GAAGGAGAAGAACAGAGACTGAACCTGTCCCAAGCCAGCACAGCGAACTGCTGTGTCTCGTACCTG  
 GAAGCTGCGTGGGAAGAAAAGGAACTTGTAGAGACACAGAGTGAAGCCCCAGGTACAAAATATCCC  
 AGCATTCCCTCCAGCGGGCCTGTTTCTGTTGATGAGCTAGACTTGGAAAGGAACTTTGTCAAGCTT  
 AGAAACAACCTCTGAGGAGGACCAGCCTTAGGTGGGTGGATGCTAAAAAGAACTTCTGTCCGTGTC  
 AGATGTTGTATATAAATTTCCCTCAAGTTTTGTGCTTCAAGTGGACAGACGGTCACTATTTGGGCAT  
 CAAACACTGGGGTTAGTCTAATCCTCCCAGTGATTTAGTCTGGAAGAGTGAACTACCTGGGGTACA  
 GGGGATAATATAAGGATTGTCTCATGAACAGCAATAAAGAGGAGATTGCAGAGCGAACCTGGTGGC  
 AATCCTGAGAGAGGCAGAGGTGAATCTGAGGAGGAGAAATATGATGAAGAGGATGTTACTGGAACAG  
 AGGTACTTACGACGACAGCCAAAAGAAAGAAATGTTGTTCCATCTCATGATTTGGCTCT  
 GGTGATGAACCAACAAATTAGGGTCTTCATAGAGCTGATGATCCCAGCTGTTCTGTTATGTAGCAG  
 ATCTTGGAAATCCCAATGAGAAGCCGTTACTTTTCAGTGTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTAATGAATTGG  
 AATGTAAGATGCTGTTATTGGAGTTGCACTTGTGTTTTGTTTTATATGGAACCTGGTATTTTTCT  
 GTTGGGTATTCTTTGGGGTGGGGGGGAGGAATGAGGACTGGACTGGTTGCAACACAATGAAATTTGTT  
 TGATTATTCAGTTTCTCTCACCTCAGAAGGTGCCTTTTCTTAACTGGCTATTAGAGATCTTCCATGAA  
 GGTTAAAAATTTAAGGGAAGAACTGGACCAGTCATAAAACACATGGCTCTTTTTAATCCCAATACG  
 TCAGAGGAAGCACATTGTATCCAGCGGGTAAGAACGTTGTGTTAAATCAGATTAATAACACGTCATGG  
 TGTGCCGTGTGAGTAGTCAACACATTAGTGTGTGACTGGGCTAATCTGCTGCATCCTCTAAGATTTT  
 ATTTAAATAGCAACTTAACCTGGTTAGGTGGGCATGCAATGGAACAGAGATTCGTCAAGTCTTGGTT  
 GAAAACGGCAGCTTCTCTCTTCTCCACAATGGGACCATTGGATTCATTGCCCCAGGGCGTTGCAGCA  
 CTAAGCTATGATGTTTGGGAGTAGTATTGGTAGAACTACACTGTAGCTTACAGCTTAACTTAT  
 ACCTACTGTTTTCAACAGAGGTCCCTGTAGAGCATTCTTAGAAGGGATAGGGGGACTAACTATGAAGT  
 AAAAAAAGGTCTCATGAAGAAAGTATGTCTGGATTTCCATGTAATAGCTTGTGCTGTAATTTGGCAA  
 CTGAAAAAATACTGGAATAAATTCATAAATCTTCAATCAGCACAGGTGTTTTGAAAGAAAAAAGT  
 GTGTGATTTCCCTGCTTCTACAGTATTCGTTACATTTTCATGGTGCTATGACATTTGGTTAATTTAT  
 ATGTCTGTTAAATTTGAGGTATTGGGTTATTAGATTTAGTATAGCTTTGCATTTATGACACACTATTT  
 ACATCTTGCTGGCTTTAAAGGAAATATAATTTAATGCTCAACTGCAAGAAGTGTTTTTTGGAGATGTA  
 CAGTATATTTCCATTGAGCCTCTTAATTTGCACAGTCTGCTGCTGAGCTTCACAATCTTCCAGTGTGAG  
 TGTAGGTTATTGTTGAATCGCACAGTTAGCACTTTCACAAATGACTCTATCAAACAGGTGAAAATCCT  
 AACCTTTTTATTTTGTCTTTAAGCCAAAGAAGAAATATGTCCGTTTTTATACACTGATGTAAATTTAA  
 ATATGTAACACAGCTATTTATTGGATCAGTGTGTAACCTGCAGTTCAAATTTCTGTCACTGGGTAAAG  
 TGTATGTGTTTATTAACCTTTTTTTGACGAGTCTTCTCCAAATGTTTGGTAGTTTGGAAATATTA  
 TTTTCCAGTATGTTACTGTTGGATGCTATTTAGATAAATTAATTAACCAATACAAATGTAATAA  
 TTTTCAAAGCACACTGAATGTAATTTGTGCCTGCATAGATTTCTGCACAGTTCATAAGATCCTTTTT

TTTACCCCATTTATTTGAGTTGAAATGCTAGATATATGTTTGTGTTTTTTCTGGTGTACAAAACCTT  
GTAGGACACTGAATATGATGTAAGTCAAGTCATTTATTGTGAAGTCATATATACCACAGCGAGTTAA  
TGGCCTTATTGTAATGGCATTATCTTGTGTCACAAATATATTGCTTCATTTTGGTCCCTTTAGCACT  
GCAATTACACTGGCTGCACCTACACATTTAAATGTCATCAGTTGTGTGGGAATGCTGAAAATGTGAAA  
GTTAAGGAAAATGGAGACGTGATACTGTCGGCACGCAGACGCTCTACTCTAACGTTGAATATTGCCTT  
TGTGTGGGAAATCCCATACGTGTCTTCGGTCATTTGATCATTAACCTGCATACTGTACCAAATATA  
GACATTATTTTGTATTACTTTAAATAAAGCCTTTTTTTTATTGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

## G Literatur

- Achtstätter, T., Fouquet, B., Rungger-Brändle, E. und Franke, W. W. (1989). "Cytokeratin filaments and desmosomes in the epithelioid cells of the perineurial and arachnoidal sheaths of some vertebrate species." *Differentiation*, 40, 129-149.
- Adjaye, J., Plessmann, U., Weber, K. und Dodemont, H. (1995). "Characterisation of neurofilament protein NF70 mRNA from the gastropod *Helix aspersa* reveals that neuronal and non-neuronal intermediate filament proteins of cerebral ganglia arise from separate lamin-related genes." *J Cell Sci*, 108(Pt 11), 3581-90.
- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B. und de Rosa, R. (2000). "The new animal phylogeny: Reliability and implications." *PNAS*, 97(9), 4453-4456.
- Aguinaldo, A. M., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A. und Lake, J. A. (1997). "Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals." *Nature*, 387(6632), 489-93.
- Albers, K. und Fuchs, E. (1992). "The molecular biology of intermediate filament proteins." *Int Rev Cytol*, 134, 243-79.
- Asch, W. S., Leake, D., Canger, A. K., Passini, M. A., Argenton, F. und Schechter, N. (1998). "Cloning of zebrafish neurofilament cDNAs for plasticin and gefiltin: increased mRNA expression in ganglion cells after optic nerve injury." *J Neurochem*, 71(1), 20-32.
- Bader, B. L., Jahn, L. und Franke, W. W. (1988). "Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene." *Eur J Cell Biol*, 47(2), 300-19.
- Bartek, J., Vojtesek, B., Staskova, Z., Bartkova, J., Kerekes, Z., Rejthar, A. und Kovarik, J. S. O. (1991). "A series of 14 new monoclonal antibodies to keratins: characterization and value in diagnostic histopathology." *J Pathol*, 164(3), 215-241.
- Bartnik, E. und Weber, K. (1989). "Widespread occurrence of intermediate filaments in invertebrates; common principles and aspects of diversion." *Eur J Cell Biol*, 50, 17-33.
- Bauer, H. (1996). "Biochemische und immunhistologische Charakterisierung von Intermediärfilamentproteinen des Karpfen *Cyprinus carpio*.", Diplomarbeit, Mainz.
- Becker, B., Bellin, R. M., Sernett, S. W., Huiatt, T. W. und Robson, R. M. (1995). "Synemin contains the rod domain of intermediate filaments." *Biochem Biophys Res Commun* (213), 796-802.
- Benavente, R., Krohne, G. und Franke, W. (1985). "Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*." *Cell*, 71(177-190).
- Benton, M. J. (1990). *Palaeontology*, Unwin Hyman, London.
- Bilak, S. R., Sernett, S. W., Bilak, M. M., Bellin, R. M., Stromer, M. H., Huiatt, T. W. und Robson, R. M. (1998). "Properties of the novel intermediate filament protein synemin and its identification in mammalian muscle." *Arch Biochem Biophys* (355), 63-67.
- Bovenshulte, M., Riemer, D. und Weber, K. (1995). "The sequence of a cytoplasmic intermediate filament (IF) protein from the annelid *Lumbricus terrestris* emphasizes a distinctive feature of protostomic IF proteins." *FEBS Lett*, 360, 223-226.
- Bremer, M. (2001). "Expressionsmuster und Primärstrukturen von Intermediärfilamentproteinen des Flösselhechts *Polypterus senegalus*.", Diplomarbeit, Mainz.
- Bunton, T. E. (1993). "The immunocytochemistry of cytokeratin in fish tissues." *Vet Pathol*, 30(5), 418-25.
- Cameron, C. B., Garey, J. R. und Swalla, B. J. (2000). "Evolution of the chordate body plan: new insights from phylogenetic analyses of deuterostome phyla." *Proc Natl Acad Sci*, 97(9), 4469-74.
- Campbell, N. A. (1996). *Biologie*, J. Markl, translator, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Capetanaki, Y., Milner, D. J., Weitzer, G., Tran, D. und Bradley, A. (1997). "Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences; Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin." *Cell Struct Funct*, 22(1), 103-16.
- Cary, R. B. und Klymkowsky, M. W. (1994a). "Differential organization of desmin and vimentin in muscle is due to differences in their head domains." *J Cell Biol*, 126(2), 445-56.

- Cerda, J., Conrad, M., Markl, J., Brand, M. und Herrmann, H. (1998). "Zebrafish vimentin: molecular characterization, assembly properties and developmental expression." *Eur. J. Cell Biol.*, 77, 1-13.
- Charnas, L. R., Szaro, B. G. und Gainer, H. (1992). "Identification and developmental expression of a novel low molecular weight neuronal intermediate filament protein expressed in *Xenopus laevis*." *Neurosci.*, 12, 3010-3024.
- Chou, Y. H., Rosevear, E. und Goldman, R. D. (1989). "Phosphorylation and disassembly of intermediate filaments in mitotic cells [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1989 May;86(9):3214]." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(6), 1885-9.
- Colucci Guyon, E., Portier, M. M., Dunia, I., Paulin, D., Pournin, S. und Babinet, C. (1994). "Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype." *Cell*, 79(4), 679-94.
- Conrad, M., Lemb, K., Schubert, T. und Markl, J. (1998). "Biochemical identification and tissue-specific expression patterns of keratins in the zebrafish *Danio rerio*." *Cell Tiss Res*, 293, 195-205.
- Conway, E. Y. und Parry, D. A. D. (1988). "Intermediate filament structure. 3. Analysis of sequence homologies." *Int. J. Biol. Macromol.*, 10, 79-98.
- Coulombe, P. A., Chan, Y. M., Albers, K. und Fuchs, E. (1990). "Deletions in epidermal keratins leading to alterations in filament organization in vivo and in intermediate filament assembly in vitro." *J Cell Biol*, 111(6 Pt 2), 3049-64.
- Coulombe, P. A. und Fuchs, E. (1990). "Elucidating the early stages of keratin filament assembly." *J Cell Biol*, 111(1), 153-69.
- Dahlstrand, J., Zimmermann, L. B., McKay, R. D. G. und Lendahl, U. (1992). "Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments." *J. Cell Sci.*, 103, 589-597.
- Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M. und Orcutt, B. C. (1979). *A model of evolutionary change in proteins*.
- Debus, E., Weber, K. und Osborn, M. (1983a). "Monoclonal antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament protein." *EMBO*, 2, 2305-2312.
- Dodemont, H., Riemer, D., Ledger, N. und Weber, K. (1994). "Eight genes and alternative RNA processing pathways generate an unexpectedly large diversity of cytoplasmic intermediate filament proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*." *EMBO J*, 13(11), 2625-38.
- Dodemont, H., Riemer, D. und Weber, K. (1990). "Structure of an invertebrate gene encoding cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins: implications for the origin and the diversification of IF proteins." *EMBO J*, 9(12), 4083-94.
- Döring, V. und Stick, R. (1990). "Gene structure of nuclear lamin LIII of *Xenopus laevis*; a model for the evolution of IF proteins from a lamin-like ancestor." *EMBO J*, 9(12), 4073-81.
- Eckes, B., Colucci-Guyon, E., H., S., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T. und Martin, P. (2000). "Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin." *J Cell Sci*, 113(Pt 13), 2455-2462.
- Eichner, R., Bonitz, P. und Sun, T. T. (1984). "Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression." *J Cell Biol*, 98(4), 1388-96.
- Erber, A., Riemer, D., Bovenschulte, M. und Weber, K. (1998). "Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins." *J Mol Evol*, 47(6), 751-62.
- Erber, A., Riemer, D., Hofemeister, H., Bovenschulte, M., Stick, R., Panopoulou, G., Lehrach, H. und Weber, K. (1999). "Characterization of the Hydra lamin and its gene: A molecular phylogeny of metazoan lamins." *J Mol Evol*, 49(2), 260-71.
- Felsenstein, J. (1978). "Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading." *Syst Zool*, 27, 401-410.
- Felsenstein, J. (1985). "Confidence-limits on phylogenies - An approach using the bootstrap." *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Ferrari, S., Battini, R., Kaczmarek, L., Rittling, S., Calabretta, B., de Riel, J. K., Philiponis, V., Wei, J. F. und Baserga, R. (1986). "Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene." *Mol. Cell Biol.*, 6(11), 3614-3620.
- Ferretti, P., Brockes, J. P. und Brown, R. (1991). "A new type II keratin restricted to normal and regenerating limbs and tails is responsive to retinoic acid." *Development*, 111(2), 497-507.

- Fiedler, K. (1991). *Lehrbuch der Speziellen Zoologie Band II: Wirbeltiere Teil 2: Fische*, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Fliegner, K. H. und Liem, R. K. (1991). "Cellular and molecular biology of neuronal intermediate filaments." *Int. Rev. Cytol.*, 131, 109-167.
- Fouquet, B. (1991). "Expression von Intermediärfilament-Proteinen in *Xenopus laevis*." Dissertation, Faculty of Biology, Heidelberg.
- Franke, W. W., Winter, S., von Overbeck, J., Gudat, F., Heitz, P. U. und Stahli, C. (1987b). "Identification of the conserved, conformation-dependent cyokeratin epitope recognized by monoclonal antibody (lu-5)." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 411(2), 137-47.
- Franz, J. K. und Franke, W. W. (1986). "Cloning of cDNA and amino acid sequence of a cyokeratin expressed in oocytes of *Xenopus laevis*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(17), 6475-9.
- Franz, J. K., Gall, L., Williams, M. A., Picheral, B. und Franke, W. W. (1983). "Intermediate-size filaments in a germ cell: Expression of cyokeratins in oocytes and eggs of the frog *Xenopus*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(20), 6254-8.
- Fuchs, E. (1988). "Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation." *Trends Genet*, 4(10), 277-81.
- Fuchs, E. und Cleveland, D. W. (1998). "A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease." *Cell*, 279(5350), 514-519.
- Fuchs, E. und Weber, K. (1994). "Intermediate filaments: Structure, dynamics, function and disease." *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 345-382.
- Galou, M., Colucci Guyon, E., Ensergueix, D., Ridet, J. L., Gimenez y Ribotta, M., Privat, A., Babinet, C. und Dupouey, P. (1996). "Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice." *J Cell Biol*, 133(4), 853-63.
- Garstang, W. (1928). "The morphology of the Tunicata." *Q J Micr Sci*, 72(51-189).
- Geisler, N., Kaufmann, E. und Weber, K. (1985). "Antiparallel orientation of the double-stranded coiled-coil in the tetrameric protofilament unit of intermediate filaments." *J. Mol. Biol.*, 182, 173-177.
- Geisler, N. und Weber, K. (1988). "Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments; identification of three kinase A sites in the aminoterminal head domain." *EMBO J*, 7(1), 15-20.
- Gerace, L. und Blobel, G. (1980). "The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis." *Cell*, 19, 277-287.
- Gigi, O., Geiger, B., Eshhar, Z., Moll, R., Schmid, E., Winter, S., Schiller, D. L. und Franke, W. W. (1982). "Detection of a cyokeratin determinant common to diverse epithelial cells by a broadly cross-reacting monoclonal antibody." *EMBO J*, 1(11), 1429-37.
- Giordano, S., Glasgow, E., Tesser, P. und Schechter, N. (1989). "A type II keratin is expressed in glial cells of the goldfish visual pathway." *Neuron*, 2(5), 1507-16.
- Giordano, S., Hall, C., Quitschke, W., Glasgow, E. und Schechter, N. (1990). "Keratin 8 of simple epithelia is expressed in glia of the goldfish nervous system." *Differentiation*, 44, 163-172.
- Glasgow, E., Druger, R. K., Levine, E. M., Fuchs, C. und Schechter, N. (1992). "Plasticin, a novel type III neurofilament protein from goldfish retina: increased expression during optic nerve regeneration." *Neuron*, 9(2), 373-81.
- Goldman, R. D., Goldman, A. E., Green, K. J., Jones, J. C., Jones, S. M. und Yang, H. Y. (1986). "Intermediate filament networks: organization and possible functions of a diverse group of cytoskeletal elements." *J Cell Sci Suppl*, 5, 69-97.
- Groff, J. M., Nayan, D. K. und Higgins, R. J. (1997). "Cyokeratin-filament expression in epithelial and non-epithelial tissues of the common carp (*Cyprinus carpio*)." *Cell Tissue Res*, 287, 375-384.
- Haberkamp, M. (1999). "Klonierung und Sequenzierung von Keratinen der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss*." Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Haberkamp, M., Tappe, N., Schaffeld, M. und Markl, J. (2001). "Intermediate filament proteins of the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*)." *Zoology*, 104 Suppl. IV (DZG 94.1), 28.
- Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E. und Marshal, I. C. J. (1989). "All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated." *Cell*, 57(7), 1167-77.

- Hanukoglu, I. und Fuchs, E. (1982). "The cDNA sequence of a human epidermal keratin: divergence of sequence but conservation of structure among intermediate filament proteins." *Cell*, 31, 243-252.
- Hanukoglu, I. und Fuchs, E. (1983). "The cDNA sequence of a type II cytoskeletal keratin reveals constant and variable structural domains among keratins." *Cell*, 33, 915-924.
- Hatzfeld, M. und Burba, M. (1994). "Function of type I and type II keratin head domains: their role in dimer, tetramer and filament formation." *J Cell Sci*, 107(Pt 7), 1959-72.
- Hatzfeld, M. und Franke, W. W. (1985). "Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides." *J Cell Biol*, 101(5 Pt 1), 1826-41.
- Hatzfeld, M., Maier, G. und Franke, W. W. (1987). "Cytokeratin domains involved in heterotypic complex formation determined by in-vitro binding assays." *J Mol Biol*, 197(2), 237-55.
- Hatzfeld, M. und Weber, K. (1990a). "The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression." *J Cell Biol*, 110(4), 1199-210.
- Heid, H. W., Moll, I. und Franke, W. W. (1988a). "Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles." *Differentiation*, 37(2), 137-57.
- Heid, H. W., Moll, I. und Franke, W. W. (1988b). "Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. II. Concomitant and mutually exclusive synthesis of trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicle, nail bed and matrix, lingual papilla, thymic reticulum)." *Differentiation*, 37(3), 215-30.
- Hemken, P. M., Bellin, R. M., Sernett, S. W., Becker, B., Huiatt, T. W. und Robson, R. M. (1997). "Molecular characteristics of the novel intermediate filament protein paranemin. Sequence reveals EAP-300 and IFAPa-400 are highly homologous to paranemin." *J Biol Chem*, 272(51), 32489-99.
- Hemmati - Brivanlon, A., Mann, R. W. und Harland, R. M. (1992). "A protein expressed in the growth cones of embryonic vertebrate neurons defines a new class of intermediate filament protein." *Neuron*, 9, 417-428.
- Herrmann, H. (1995). "Strukturbildende und topogene Domänen von Intermediärfilamentproteinen.", Habilitationsschrift, Heidelberg.
- Herrmann, H. und Aebi, U. (2000). "Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics." *Curr Opin Cell Biol*, 12(1), 79-90.
- Herrmann, H., Fouquet, B. und Franke, W. W. (1989a). "Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. I. cDNA clones encoding different forms of vimentin." *Development*, 105(2), 279-98.
- Herrmann, H., Fouquet, B. und Franke, W. W. (1989b). "Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. II. Identification and molecular characterization of desmin." *Development*, 105(2), 299-307.
- Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Müller, S. A., Goldie, K. N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W. W. und Aebi, U. (1996a). "Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains." *J Mol Biol*, 264(5), 933-53.
- Herrmann, H., Münick, M. D., Brettel, M., Fouquet, B. und Markl, J. (1996b). "Vimentin in a cold-water fish, the rainbow trout: highly conserved primary structure but unique assembly properties." *J. Cell Sci.*, 109, 569-578.
- Herrmann, H., Strelkov, S. V., Feja, B., Rogers, K. R., Brettel, M., Lustig, A., Haner, M., Parry, D. A., Steinert, P. M., Burkhard, P. und Aebi, U. (2000). "The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly." *J Mol Biol*, 298(5), 817-32.
- Hesse, M., Magin, T. M. und Weber, K. (2001). "Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18." *J Cell Sci*, 114(14), 2569-2575.
- Hillis, D. M., Huelsenbeck, J. P. und Cunningham, C. W. (1994). "Application and accuracy of molecular phylogenies." *Science*, 264(5159), 671-7.
- Hochleithner, M. (1996). *Störe*, Österreichischer Agrarverlag, Klosterneuburg.

- Hofemeister, H., Kuhn, C., Franke, W. W., Weber, K. und Stick, R. (2002). "Conservation of the gene structure and membrane-targeting signals of germ cell-specific lamin LIII in amphibians and fish." *Eur J Cell Biol*, 81(2), 51-60.
- Höffling, S. (2001). "Sequenzierung verschiedener Typ I-Keratine von Regenbogenforelle, Katzenhai und Flösselhecht.", Staatsexamensarbeit, Mainz.
- Höger, T., Zatloukal, K., Waizenegger, I. und Krohne, G. (1990). "Characterization of a second highly conserved B-type lamin present in cells previously thought to contain only a single B-type lamin." *Chromosoma*, 99, 379-390.
- Holcik, J. (1989). *The Freshwater Fishes Of Europe*, Aula Verlag, Wiesbaden.
- Holy, J. (2000). "Intermediate filament proteins in echinoderm coelomocytes." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 127(4), 491-504.
- Holy, J., Wessel, G., Berg, L., Gregg, R. G. und Schatten, G. (1995). "Molecular characterization and expression patterns of a B-type nuclear lamin during sea urchin embryogenesis." *Dev Biol*, 168(2), 464-78.
- Huszar, M., Gigi-Leitner, Moll, R., Franke, W. W. und Geiger, B. (1986). "Polypeptide-specific monoclonal cyokeratin antibodies in the differential diagnosis of squamous carcinomas and adenocarcinomas." *Differentiation*, 31, 141-153.
- Imboden, M., Goblet, C., Korn, H. und Vriza, S. (1997). "Cytokeratin 8 is a suitable epidermal marker during zebrafish development." *C R Acad Sci III*, 320(9), 689-700.
- Irvine, A. D. und McLean, W. H. (1999). "Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation." *Br J Dermatol*, 140(5), 815-828.
- Jones, D. T., Taylor, W. R. und Thornton, J. M. (1992). "The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences." *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)*, 8, 275-282.
- Kammerer, R. A., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Engel, J., Aebi, U. und Steinmetz, M. O. (1998). "An autonomous folding unit mediates the assembly of two stranded coiled coils." *Proc Natl Acad Sci U S A* (95), 13419-13424.
- Karabinos, A., Riemer, D., Erber, A. und Weber, K. (1998). "Homologues of vertebrate type I, II and III intermediate filament (IF) proteins in an invertebrate: the IF multigene family of the cephalochordate Branchiostoma." *FEBS Lett*, 437(1-2), 15-8.
- Karabinos, A., Riemer, D., Panopoulou, G., Lehrach, H. und Weber, K. (2000). "Characterisation and tissue-specific expression of the two keratin subfamilies of intermediate filament proteins in the cephalochordate Branchiostoma." *Eur J Cell Biol*, 79(1), 17-26.
- Kartenbeck, J. (1989). "Intermediate filament proteins. Diagnostic markers in tumour pathology." *Interdisc. Sci. Rev.*, 14(3), 278-283.
- Klymkowsky, M. W. (1995). "Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions." *Curr Opin Cell Biol*, 7(1), 46-54.
- Kouklis, P. D., Hutton, E. und Fuchs, E. (1994). "Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins." *J Cell Biol*, 127(4), 1049-60.
- Kusche, K. (1999). "Die Intermediärfilament-Proteine vom Typ I-III des Flösselhechts *Polypterus senegalus*.", Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- LaFlamme, S. E. und Dawid, I. B. (1990a). "Differential keratin gene expression during the differentiation of the cement gland of *Xenopus laevis*." *Dev Biol*, 137(2), 414-8.
- Langbein, L., Rogers, M. A., Praetzel, S., Aoki, N., Winter, H. und Schweizer, J. (2002). "A novel epithelial keratin, hK6irs1, is expressed differentially in all layers of the inner root sheath, including specialized huxley cells (Flügelzellen) of the human hair follicle." *J Invest Dermatol*, 118(5), 789-99.
- Langbein, L., Rogers, M. A., Winter, H., Praetzel, S., Beckhaus, U., Rackwitz, H. R. und Schweizer, J. (1999). "The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle." *J Biol Chem*, 274(28), 19874-84.
- Langbein, L., Rogers, M. A., Winter, H., Praetzel, S. und Schweizer, J. (2001). "The catalog of human hair keratins. II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins." *J Biol Chem*, 276(37), 35123-32.
- Lazarides, E. (1982). "Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins." *Annu. Rev. Biochem.*, 51, 219-250.

- Lazarides, E., Granger, B. L., Gard, D. L., O'Connor, C. M., Breckler, J., Price, M. und Danto, S. I. (1982). "Desmin- and vimentin-containing filaments and their role in the assembly of the Z disk in muscle cells." *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 46, 351-378.
- Lendahl, U., Zimmermann, L. B. und McKay, R. D. G. (1990). "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein." *Cell*, 60, 585-595.
- Lenz-Böhme, B., Wismar, J., Fuchs, S., Reifegerste, R., Buchner, E., Betz, H. und B., S. (1997). "Insertional mutation of the Drosophila nuclear lamin Dmo gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae." *J Cell Biol*, 137(5), 1001-1016.
- Leube, R. E. und Kartenbeck, J. (1996). "Molekulare Komponenten der Intermediärfilamente und ihre Verankerungsstrukturen in Epithelzellen: Differenzierungsmarker in der Gewebe- und Tumordiagnostik." *Onkologie*, W. J. Zeller, H. Zur Hausen, eds., ecomed, Landsberg/Lech.
- Li, Z., Colucci Guyon, E., Pincon Raymond, M., Mericskay, M., Pournin, S., Paulin, D. und Babinet, C. (1996). "Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin." *Dev Biol*, 175(2), 362-6.
- Li, Z., Lilienbaum, A., Butler Browne, G. und Paulin, D. (1989). "Human desmin-coding gene: complete coding sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development." *Gene*, 78(2), 243-254.
- Li, Z., Mericskay, M., Agbulut, O., Butler Browne, G., Carlsson, L., Thornell, L., Babinet, C. und Paulin, D. (1997). "Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle." *J. Cell. Biol.*, 139(1), 129-144.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P. und Darnell, J. (1996). *Molekulare Zellbiologie*, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Loewinger, L. und McKeon, F. (1988). "Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm." *EMBO J*, 7(8), 2301-2309.
- Loh Soh, H., Chan Wee, T., Gong, Z., Lim Tit, M. und Chua Kim, L. (2000). "Characterization of a zebrafish (*Danio rerio*) desmin cDNA: An early molecular marker of myogenesis." *Differentiation*, 65(5), 247-254.
- Ludwig, A., Belfiore, N. M., Pitra, C., Svirsky, V. und Jenneckens, I. (2001). "Genome Duplication Events and Functional Reduction of Ploidy Levels in Sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*)." *Genetics*, 158, 1203-1215.
- Mallatt, J. und Winchell, C. J. (2002). "Testing the new animal phylogeny: first use of combined large-subunit and small-subunit rRNA gene sequences to classify the protostomes." *Mol Biol Evol*, 19(3), 289-301.
- Marinelli, W. und Strenger, A. (1953). *Vergleichende Anatomie und Morphologie der Wirbeltiere*, Frank Deuticke, Wien.
- Markl, J. (1991). "Cytokeratins in mesenchymal cells: impact on functional concepts of the diversity of intermediate filament proteins." *J. Cell. Sci.*, 98, 261-264.
- Markl, J. und Franke, W. W. (1988). "Localization of cytokeratins in tissues of the rainbow trout: fundamental differences in expression pattern between fish and higher vertebrates." *Differentiation*, 39, 97-122.
- Markl, J. und Schechter, N. (1998). "Fish intermediate filament proteins in structure, function and evolution." *Intermediate Filaments*, H. Herrmann, J. R. Harris, eds., Plenum Press, New York, 1-33.
- Markl, J., Winter, S. und Franke, W. W. (1989). "The catalog and the expression complexity of cytokeratins in a teleost fish, the rainbow trout." *Eur. J. Cell. Biol.*, 50, 1-16.
- McLean, W. H. und Lane, E. B. (1995). "Intermediate filaments in disease." *Curr Opin Cell Biol*, 7(1), 118-25.
- Mencarelli, C. und Cotelli, F. (1997). "Intermediate filament proteins immunologically related to cytokeratins in the oocyte of the fish *Cyprinus carpio*." *Zygote*, 5(3), 207-12.
- Moir, R. D., Spann, T. P., Lopez-Soler, R. I., Yoon, M., Goldman, A. E., Khuon, S. und Goldman, R. D. (2000). "Review: the dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle-- relationship between structure and function." *J Struct Biol*, 129(2-3), 324-34.

- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. und Krepler, R. (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." *Cell* 31, 11-24.
- Nagle, R. B. (1988). "Intermediate filaments: a review of the basic biology." *Am J Surg Pathol*, 12 Suppl 1, 4-16.
- Nei, M. und Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York.
- Nelson, J. S. (1994). *Fishes of the world*, John Wiley & Sons, New York.
- Newey, S. E., Howman, E. V., Ponting, C. P., Benson, M. A., Nawrotzki, R., Loh, N. Y., Davies, K. E. und Blake, D. J. (2001). "Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle." *J Biol Chem*, 276(9).
- Nigg, E. A. (1992). "Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina." *Semin Cell Biol*, 3(4), 245-253.
- Osborn, M. und Weber, K. (1983). "Tumor diagnosis by intermediate filaments typing: A novel tool for surgical pathology." *Lab. Invest.*, 48, 372-394.
- Parry, D. A. D. und Steinert, P. M. (1999). "Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism." *Q REV BIOPHYS*, 32(2), 99-187.
- Pruss, R. M., Mirsky, R., Raff, M. C., Thorpe, R., Dowding, A. J. und Anderton, B. H. (1981). "All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody." *Cell*, 27(3 Pt 2), 419-28.
- Quinlan, R. A. und Franke, W. W. (1982). "Heteropolymer filaments of vimentin and desmin in vascular smooth muscle tissue and cultured baby hamster kidney cells demonstrated by biochemical crosslinking." *Proc.Nat. Acad. Sci.*, 79, 3452-3456.
- Riemer, D., Dodemont, H. und Weber, K. (1991). "Cloning of the non-neuronal intermediate filament protein of the gastropod *Aplysia californica*; identification of an amino acid residue essential for the IFA epitope." *Eur J Cell Biol*, 56(2), 351-7.
- Riemer, D., Dodemont, H. und Weber, K. (1992). "Analysis of the cDNA and gene encoding a cytoplasmic intermediate filament (IF) protein from the cephalochordate *Branchiostoma lanceolatum*; implications for the evolution of the IF protein family." *Eur J Cell Biol*, 58(1), 128-35.
- Riemer, D., Dodemont, H. und Weber, K. (1993). "A nuclear lamin of the nematode *Caenorhabditis elegans* with unusual structural features; cDNA cloning and gene organization." *Eur J Cell Biol*, 62(2), 214-23.
- Riemer, D., Karabinos, A. und Weber, K. (1998). "Analysis of eight cDNAs and six genes for intermediate filament (IF) proteins in the cephalochordate *Branchiostoma* reveals differences in the IF multigene families of lower chordates and the vertebrates." *Gene*, 211(2), 361-73.
- Riemer, D. und Weber, K. (1998). "Common and variant properties of intermediate filament proteins from lower chordates and vertebrates; two proteins from the tunicate *Styela* and the identification of a type III homologue." *J Cell Sci*, 111(Pt 19), 2967-75.
- Röber, R. A., Weber, K. und Osborn, M. (1989). "Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study." *Development*, 105(2), 365-78.
- Romer, A. S. und Parsons, T. S. (1983). *Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere*, Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin.
- Riemer, D., Wang, J., Zimek, A., Swalla, B. J. und Weber, K. (2000). "Tunicates have unusual nuclear lamins with a large deletion in the carboxyterminal tail domain." *Gene*, 255(2), 317-25.
- Saitou, N. und Nei, M. (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol*, 4, 406-425.
- Schaffeld, M., Haberkamp, M., Tappe, N., Kusche, K., Schätzlein, S., Bremer, M. und Markl, J. (2001a). "Intermediate filament protein evolution in fish: Sequence from sturgeon and bichir." *Zoology*, 104, Suppl. IV (DZG 94.1), 35.
- Schaffeld, M., Haberkamp, M., Braziulis, E., Lieb, B. und Markl, J. (2002b). "Type II keratin cDNAs from the rainbow trout: implications for keratin evolution." *Differentiation*, 70.
- Schaffeld, M., Herrmann, H., Schultess, J. und Markl, J. (2001b). "Vimentin and desmin of a cartilaginous fish, the shark *Scyliorhinus stellaris*: Sequence, expression patterns and in vitro assembly." *E. J. C. Biol*, 80(11), 692-702.

- Schaffeld, M., Höffling, S., Haberkamp, M., Conrad, M. und Markl, J. (2002a). "Type I keratin cDNAs from the rainbow trout: independent radiation of keratins in fish." *Differentiation*, 70.
- Schaffeld, M., Löbbbecke, A., Lieb, B. und Markl, J. (1998). "Tracing keratin evolution: Catalog, expression patterns and primary structure of shark (*Scyliorhinus stellaris*) keratins." *Eur. J. Cell. Biol.*, 77(2), 69-80.
- Schätzlein, S. (2001). "Klonierung und Sequenzierung von Keratinen des Flösselhechts *Polypterus senegalus*." Diplomarbeit, Mainz.
- Schultess, J. (2001). "Molekulare Evolution der Intermediärfilament-Proteine des Flussneunauges *Lampetra fluviatilis*." Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Shoeman, R. L. und Traub, P. (1993). "Assembly of intermediate filaments." *Bioessays*, 15(9), 605-11.
- Shu, D. G., Chen, L., Han, J. und Zhang, X. L. (2001). "An Early Cambrian tunicate from China." *Nature*, 411(6836), 472-3.
- Siewing, (1985). *Lehrbuch der Zoologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Steinert, P. M. (1990). "The two-chain coiled-coil molecule of native epidermal keratin intermediate filaments is a type I-type II heterodimer." *J Biol Chem*, 265(15), 8766-74.
- Steinert, P. M. (1991b). "Organization of coiled-coil molecules in native mouse keratin 1/keratin 10 intermediate filaments: evidence for alternating rows of antiparallel in-register and antiparallel staggered molecules." *J Struct Biol*, 107(2), 157-74.
- Steinert, P. M., Chou, P.-Y., Prahlad, V., Parry, D. A. D., Marekov, L. N., Wu, K. C., Jang, S.-I. und Goldman, R. D. (1999b). "A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein: limited co-assembly *in vitro* to form hetero-polymers with Type III vimentin and Type IV a-internexin." *J. Biol. Chem.*, 274, 9881-9890.
- Steinert, P. M., Idler, W. W., Cabral, G., Gottesman, M. M. und Goldman, R. D. (1981). "In vitro assembly of homopolymer and copolymer filaments from intermediate filament subunits of muscle and fibroblastic cells." *Proc. Anat. Acad. Sci.*, 78, 3692-3697.
- Steinert, P. M., Marekov, L. N., Fraser, R. D. und Parry, D. A. (1993a). "Keratin intermediate filament structure. Crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly." *J Mol Biol*, 230(2), 436-52.
- Steinert, P. M., Marekov, L. N. und Parry, D. A. D. (1993b). "Diversity of intermediate filament structure: evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments." *J. Biol. Chem.*(268), 24916-24925.
- Steinert, P. M. und Roop, D. R. (1988). "Molecular and cellular biology of intermediate filaments." *Annu Rev Biochem*, 57, 593-625.
- Stewart, M. (1993). "Intermediate filament structure and assembly." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 3-11.
- Stick, R. (1988). "cDNA cloning of the developmentally regulated lamin LIII of *Xenopus laevis*." *EMBO J*, 8(10), 3189-97.
- Stick, R. (1992). "The gene structure of *Xenopus* nuclear lamin A: a model for the evolution of A-type from B-type lamins by exon shuffling." *Chromosoma*, 101(9), 566-74.
- Stick, R. (1994). "The gene structure of B-type nuclear lamins of *Xenopus laevis*: implications for the evolution of the vertebrate lamin family." *Chromosome Res*, 2(5), 376-82.
- Stick, R., Angres, B., Lehner, C. F. und Nigg, E. A. (1988). "The fates of chicken nuclear lamin proteins during mitosis: evidence for a reversible redistribution of lamin B2 between inner nuclear membrane and elements of the endoplasmic reticulum." *J Cell Biol*, 107(2), 397-406.
- St-Pierre, J., Vincent, M. und Dufresne, L. (1994). "Effects of 6-dimethylaminopurine on the length of the cell cycle and on the state of phosphorylation of putative intermediate filament proteins in sea urchin embryos." *Cell Motil Cytoskeleton*, 29(2), 131-40.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H., Geisler, N., Lustig, A., Ivaninskii, S., Zimbelmann, R., Burkhard, P. und Aebi, U. (2001). "Divide-and-conquer crystallographic approach towards an atomic structure of intermediate filaments." *J Mol Biol*, 306(4), 773-781.
- Stuurman, N., Heins, S. und Aebi, U. (1998). "Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions." *J Struct Biol*, 122(1-2), 42-66.
- Szaro, B. G., Pant, H. C., Way, J. und Battey, J. (1991). "Squid low molecular weight neurofilament proteins are a novel class of neurofilament protein." *J. Biol. Chem.*, 266, 15035-15041.

- Tappe, N. (2000). "Charakterisierung der Intermediärfilament-Proteine vom Typ I-III des Störs *Acipenser baeri*." Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Telford, M. J. und Holland, P. W. (1993). "The phylogenetic affinities of the chaetognaths: a molecular analysis." *Mol Biol Evol*, 10(3), 660-76.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. G. (1997). "The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res*, 25(24), 4876-82.
- Tomarev, S. I., Zinovievam, R. D. und Piatigorky, J. (1993). "Primary structure and lens-specific expression of genes for an intermediate filament protein and  $\beta$ -tubulin in cephalopods." *Biochem. Biophys. Acta*, 1216, 245-254.
- Traub, P., Kuhn, S. und Grub, S. (1993). "Separation and characterization of homo and hetero-oligomers of the intermediate filament proteins desmin and vimentin." *J Mol Biol*, 230(3), 837-56.
- Viac, J., Reano, A., Brochier, J., Staquet, M.-J. und Thivolet, J. (1983). "Reactivity pattern of a monoclonal antikeratin antibody (KL1)." *J Invest Dermatol*, 81, 351-354.
- Wada, H. (1998). "Evolutionary history of free-swimming and sessile lifestyles in urochordates as deduced from 18S rDNA molecular phylogeny." *Mol Biol Evol*, 15(9), 1189-94.
- Wada, H. und Satoh, N. (1994). "Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18S rDNA." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(5), 1801-4.
- Wang, J., Karabinos, A., Schunemann, J., Riemer, D. und Weber, K. (2000). "The epidermal intermediate filament proteins of tunicates are distant keratins; a polymerisation-competent hetero coiled coil of the Styela D protein and *Xenopus* keratin 8." *Eur J Cell Biol*, 79, 478-487.
- Wang, J., Karabinos, A., Zimek, A., Meyer, M., Riemer, D., Hudson, C., Lemaire, P. und Weber, K. (2002). "Cytoplasmic intermediate filament protein expression in tunicate development: a specific marker for the test cells." *Eur J Cell Biol*, 81(5), 302-11.
- Weber, K., Plessmann, U., Dodemont, H. und Kossmagk Stephan, K. (1988). "Amino acid sequences and homopolymer-forming ability of the intermediate filament proteins from an invertebrate epithelium." *EMBO J*, 7(10), 2995-3001.
- Weber, K., Plessmann, U. und Traub, P. (1989a). "Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina." *FEBS Lett*, 257(2), 411-4.
- Weber, K., Plessmann, U. und Ulrich, W. (1989b). "Cytoplasmic intermediate filament proteins of invertebrates are closer to nuclear lamins than are vertebrate intermediate filament proteins; sequence characterization of two muscle proteins of a nematode." *EMBO J*, 8(11), 3221-3227.
- Weitzner, G., Milner, D. J., Kim, J. U., Bradley, A. und Capetanaki, Y. (1995). "Cytoskeletal control of myogenesis: A desmin null mutation blocks the myogenic pathway during embryonic stem cell differentiation." *Dev. Biol.*, 172(2), 422-439.
- Wilkins, M. R. und Williams, K. L. (1997b). "Cross-Species Protein Identification using Amino Acid Composition, Peptide Mass Fingerprinting, Isoelectric Point and Molecular Mass: A Theoretical Evaluation." *J theor Biol*, 186, 7-15.
- Winkles, J. A., Sargent, T. D., Parry, D. A., Jonas, E. und Dawid, I. B. (1985). "Developmentally regulated cytokeratin gene in *Xenopus laevis*." *Mol Cell Biol*, 5(10), 2575-81.
- Woodcock-Mitchell, J., Eichner, R., Nelson, W. G. und Sun, T. T. (1982). "Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies." *J Cell Biol*, 95(2 Pt 1), 580-8.
- Yamaguchi, A., Yamashita, M., Yoshikuni, M. und Nagahama, Y. (2001). "Identification and molecular cloning of germinal vesicle lamin B3 in goldfish (*Carassius auratus*) oocytes." *Eur J Biochem*, 268(4), 932-9.
- Zhao, Y. und Szaro, B. G. (1997). "Xefiltin, a new low molecular weight neuronal intermediate filament protein of *Xenopus laevis*, shares sequence features with goldfish gefiltin and mammalian alpha-internexin and differs in expression from XNIF and NF-L." *J. Comp. Neurol.*, 377, 351-364.

